Amiclenomycin-Peptide

Isolierung und Strukturaufklärung neuer Biotin-Antimetaboliten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Armin Kern
aus Stuttgart-Bad Cannstatt

1983

UNIV.
LIBRARY
BRIL.

Amiclenomycin-Peptide

Isolierung und Strukturaufklärung neuer Biotin-Antimetaboliten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Armin Kern
aus Stuttgart-Bad Cannstatt

1983

Tag der mündlichen Prüfung:	5. Dezember 1983
Dekan:	Prof. Dr. J. Strähle
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. G. Jung
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Bayer

Herrn Professor Dr. G. Jung danke ich für viele Diskussionen und Anregungen sowie für die großzügige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Ferner danke ich Herrn Professor Dr. E. Bayer für die Überlassung von Institutseinrichtungen.

Der Firma Dr. Karl Thomae GmbH, Biberach/Riss, danke ich für die Förderung dieser Arbeit. Besonderer Dank gilt dabei Herrn Dr. R. G. Werner und Herrn H. B. Sick.

Die Fermentationsoptimierung des Vitamin E-Antagonisten wurde gleichzeitig am Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I, Universität Tübingen, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Zähner von Herrn M. Poetsch bearbeitet. Für die Bereitstellung des Rohproduktes sowie die Herstellung zahlreicher Testplatten sei ihm herzlich gedankt.

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1.1.	Einleitung	1
1.2.	Problemstellung	5
2.	Aufreinigung und Isolierung	6
2.1.	Vorversuche	6
2.1.1.	Dünnschichtchromatographische Untersuchungen	6
2.1.2.	Stabilitätstests	7
2.1.3.	Isoelektrische Fokussierung	7
2.1.4.	Extraktionsversuche	8
2.1.5.	Verteilungsverhalten	8
2.1.6.	Multiplikative Verteilungsverfahren	8
2.1.7.	Chromatographische Trennungen	9
2.1.8.	Ergebnisse der Voruntersuchungen	10
2.2.	Erste Charakterisierung der Wirkstoffe	11
2.3.	Entwicklung eines geeigneten Fermentationsmediums	14
2.4.	Aufarbeitung von Kulturfiltrat eines 20 l-Minimalfermenters	14
2.5.	Aufarbeitung des Kulturfiltrats von vier 200 l-Minimalfermentern	17
3.	Charakterisierung der Wirkstoffe	22
3.1.	Spektroskopische Methoden zur Strukturaufklärung niedermolekularer Verbindungen	22
3.1.1.	^{13}C-NMR-Spektroskopie	23
3.1.2.	^{1}H-NMR-Spektroskopie	24
3.1.3.	Doppelresonanz-Experimente	24
3.2.	Charakterisierung des gemeinsamen Grundkörpers von BC 1 bis 6	26
3.2.1.	^{13}C-NMR-Spektren	26
3.2.2.	^{1}H-NMR-Spektren	27
3.2.3.	Aminosäurenanalyse	27

4.	Strukturaufklärung der N-Methylaminosäuren enthaltenden Antibiotika BC 1, 3 und 4	34
4.1.	Strukturermittlung von BC 1	34
4.1.1.	Aminosäurenanalysen	34
4.1.2.	NMR-spektroskopische Untersuchung von BC 1	35
4.1.2.1.	Doppelresonanzexperimente an BC 1	38
4.1.2.2.	NMR-Spektren von N-Methylisoleucin	45
4.1.3.	Gaschromatographisch-massenspektroskopische Untersuchung des Totalhydrolysats von BC 1	47
4.1.4.	NMR-Spektren von BC 1	49
4.1.5.	Sequenzanalyse von BC 1	52
4.1.6.	Massenspektren von BC 1	54
4.1.6.1.	FD-Massenspektren	54
4.1.6.2.	Gaschromatographisch-massenspektroskopische Untersuchungen	55
4.2.	Strukturermittlung von BC 4	60
4.2.1.	Aminosäurenanalyse	60
4.2.2.	FD-Massenspektrum von BC 4	63
4.2.3.	NMR-Spektren von BC 4	64
4.3.	Strukturermittlung von BC 3	67
4.3.1.	Gaschromatographisch-massenspektroskopische Untersuchungen	67
4.3.2.	Sequenzierung von BC 3	75
4.3.3.	NMR-Spektren	76
4.3.3.1.	NMR-Spektren von N-Methylvalin	76
4.3.3.2.	NMR-Spektren von BC 3	77
5.	Strukturaufklärung der Antibiotika BC 2, 5 und 6	81
5.1.	Aminosäurenanalyse	81
5.2.	Massenspektren	84
5.2.1.	FD-Massenspektren	84
5.2.2.	Gaschromatographisch-massenspektroskopische Untersuchungen	87
5.3.	Dansyl-Edman-Abbau von BC 2, 5 und 6	90
5.4.	NMR-Spektren von BC 2, 5 und 6	91

6.	Infrarot-Spektroskopie	99
7.	Circulardichroismus	103
8.	Ultraviolettabsorptions-Spektroskopie	105
9.	Zusammenfassung der Ergebnisse der Strukturuntersuchungen	106
10.	Biologische Eigenschaften der Biotin-Antimetaboliten BC 1 bis 6	112
10.1.	Biotin	112
10.2.	Antimetaboliten des Biotin	113
10.3.	Untersuchung der biologischen Wirkung von Amiclenomycin	116
10.4.	Biologische Wirkung von BC 1 bis 6	117
10.4.1.	Antibiotische Wirkung	117
10.4.2.	Toxizität	119
10.4.3.	Einfluß der Wirkstoffe BC 1 - 6 und BC L auf Lymphozyten-Proliferation	119
11.	Derivate	120
11.1.	Enzymatische Abbaureaktionen	120
11.2.	Derivatisierung der Amino- und Carboxy-Funktionen der Peptide	124
11.2.1.	Acylierung	124
11.2.2.	Veresterung	125
11.2.3.	N,N'-Diacetyl-peptid-methylester	126
11.2.4.	N-Alkylierung der Wirkstoffe	127
11.3.	Derivatisierungen des Cyclohexa(1,4)dien-Systems	129
11.3.1.	Oxidation	129
11.3.1.1.	Oxidation mit Permanganat	129
11.3.1.2.	Epoxidierung mit m-Chlorperbenzoesäure	130

11.3.2.	Thermischer Abbau	130
11.3.3.	Hydrierung	130
11.3.4.	Halogenierung	131
11.4.	Analyse essentieller Wirkstrukturen der Antibiotika	133
12.	Translokation der Wirkstoffe durch die Zellmembran von E.coli	134
12.1.	Oligopeptidtransportsysteme bei E.coli	134
12.2.	Vehicle-warhead-Modell	135
13.	Experimenteller Teil	138
13.1.	Chemikalien	138
13.2.	Dünnschichtchromatographie	138
13.3.	Anfärbemethoden	139
13.4.	Flüssigkeitschromatographie	140
13.4.1.	Gelchromatographie	140
13.4.2.	HPLC	140
13.5.	CRAIG-Verteilung	141
13.6.	Aminosäurenanalysen	142
13.6.1.	Aminosäurenanalysator	142
13.6.2.	Gaschromatographische Konfigurationsuntersuchungen	142
13.6.2.1.	Acylierung des Hydrolysats	142
13.6.2.2.	Darstellung von Urethanderivaten	142
13.7.	Dansyl-Edman-Abbau	143
13.8.	Darstellung von Derivaten	144
13.8.1.	Selektive Hydrolyse von Amiclenomycin zu Homophenylalanin	144
13.8.2.	Hydrierung	145
13.8.3.	Iodierung	145
13.8.4.	Chlorierung	145
13.8.5.	Oxidation mit Kaliumpermanganat	145
13.8.6.	Acylierung	146
13.8.7.	Veresterung	146
13.8.8.	Darstellung von N-Acetyl-peptidmethylestern	146

13.8.9.	Reduktive Alkylierung	146
13.8.10.	Epoxidierung	146
13.9.	Spektroskopische Untersuchungsmethoden	147
13.9.1.	NMR-Spektroskopie	147
13.9.2.	Massenspektroskopie	147
13.9.3.	IR-Spektroskopie	148
13.9.4.	CD-Spektroskopie	148
13.10.	Biologische Tests und Materialien	149
13.10.1.	Zusammensetzung der Fermentationsmedien	149
13.10.2.	Herstellung der Testplatten	149
13.10.4.	Bioautographie von Chromatogrammen	150
13.10.5.	Vitamin E-Kreuztest	150
13.10.6.	Enzymatische Spaltung mit Pronase P	150
13.10.7.	Lymphozyten-Proliferationstest	150
14.	Zusammenfassung	152
15.	Literaturverzeichnis	153

ABKÜRZUNGEN

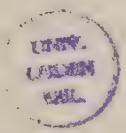
Die Abkürzungen der Aminosäuren entsprechen den IUPAC-Regeln (1).

Acm	Amiclenomycin
ATCC	American type culture collection
CON A	Concanavalin A
CD	Circulardichroismus
DC	Dünnschichtchromatographie
FD	Felddesorption
GC	Gaschromatographie
h	Stunde
HPhe	Homophenylalanin
IR	Infrarot
Me	Methyl-
MHz	Megahertz
min	Minute
MS	Massenspektroskopie
iPr	Isopropyl-
nPr	n-Propyl-
Pfp	Pentafluorpropionyl-
Ph	Phenyl-
SFD	Selektive Entkopplung
TDM	4,4'-Tetramethyldiamino-diphenylmethan
Tfa	Trifluoracetyl-
UV	Ultraviolett

1.1. EINLEITUNG

Naturstoffchemie ist eines der ältesten Gebiete der Chemie. Die in biologischen Systemen vorhandenen Substanzen geben auch heute noch sowohl der Analytik als auch der synthetischen Chemie interessante Probleme auf. Neben die Untersuchung des primären Stoffwechsels - von Verbindungen wie Aminosäuren, Nucleinsäuren, Lipiden, Sacchariden sowie deren Biopolymere - tritt in neuerer Zeit das Studium von Produkten des sekundären Stoffwechsels. Zu diesen Sekundärmetaboliten führen Stoffwechselwege und Enzyme, die nicht für das Wachstum oder die Erhaltung der Zelle benötigt werden.

Sekundären Metaboliten ist gemeinsam, daß sie bei Mikroorganismen jeweils nur von bestimmten Familien oder Gattungen gebildet werden und für diese definierte Gruppe damit charakteristisch sind. Bei vielzelligen Organismen können sie nur von bestimmten Organen, Geweben oder Zellen synthetisiert werden. Ein weiteres Merkmal dieser sekundären Metaboliten ist, daß durch sie kein unmittelbarer Nutzen für die sie produzierende Zelle entsteht und somit ihre Funktion nicht direkt ersichtlich wird. Andererseits zeichnen sich zahlreiche dieser sekundären Metaboliten durch eine starke physiologische Wirkung aus. Diese Wirkung kann man sich bei der Suche nach biologisch aktiven Substanzen zunutze machen.

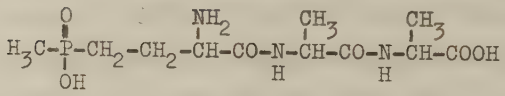


So gehören zu den sekundären Metaboliten auch die Antibiotika, Wirkstoffe, die bereits in minimaler Konzentration Wachstum hemmen können (2). Das klassische Screening auf Antibiotika, mit dem weltweit jährlich über eine Million Mikroorganismen auf die Bildung solcher Wirkstoffe untersucht werden, geht besonders auf WAKSMAN (3) zurück. Es wird dabei eine möglichst hohe Korrelation zwischen Test und späterer Anwendung gesucht. Für Krankheitserreger repräsentative Mikroorganismen wie Staphylococcus aureus, Streptococcus faecalis, Escherichia coli und Pseudomonas aeruginosa werden als Testkeime bei der Suche nach Hemmstoffen eingesetzt. Auf einer Nähragarplatte, die mit dem Testkeim dicht beimpft ist, bleibt in der Umgebung von lokal begrenzt aufgetragenem Antibiotikum das Wachstum aus. Nach Bebrüten ist dies an der Bildung eines Hemmhofes im Bakterienrasen zu erkennen. Üblicherweise kultiviert man dabei den Testkeim auf einer Nähragarplatte mit komplexem Nährmedium. Dieses enthält für das Wachstum von Bakterien optimale Nährstoffe wie Hefeextrakt, Malzextrakt oder Fleischextrakt. Der Ersatz der optimalen, komplexen Nährböden im Test durch einfache, chemisch definierte Minimalmedien, die nur noch elementare Nährstoffansprüche des Testkeimes berücksichtigen, führte zu einer neuen Gruppe von Antibiotika, den Antimetaboliten. Die biologische Aktivität dieser Wirkstoffe kann nur auf Minimalmedium erkannt werden, da Substrate oben genannter Komplexmedien ihre wachstumshemmende Wirkung aufheben. WOOLLEY (4,5) charakterisiert Antimetaboliten als Strukturanaloge essentieller Metaboliten wie Aminosäuren, Nucleoside oder Vitamine, die Mangelsymptome dieser Metaboliten im Lebewesen hervorrufen.

Diese Definition führte in der Praxis zu einer Reihe von Schwierigkeiten: So können Struktur-Analogiebetrachtungen erst nach Isolierung und Strukturaufklärung aufgestellt werden. Ferner zeigen manche Antimetaboliten, die eindeutige Mangelsymptome eines Metaboliten hervorrufen, keine Strukturähnlichkeiten zu diesem. Als Erklärung für die Einstufung als Antimetabolit wurde dann oft die Komplexität der Stoffwechselwege herangezogen (6). Handelt es sich bei dem Metaboliten um komplexe Makromoleküle (Zellwandkomponenten, Proteine, Nucleinsäuren), welche nur an intakten Zellen untersucht werden können, wird die Bestimmung der von Antimetaboliten hervorgerufenen Mangelsymptome sehr schwierig. Aufgrund dieser Probleme stellten PRUESS und SCANNEL (7) eine neue Definition auf, die ein handhabbares Kriterium für die Suche nach neuen Antimetaboliten bietet: Antimetaboliten sind nach diesen Autoren organische Verbindungen, die bereits in niedriger Konzentration Wachstum oder Lebensfähigkeit eines Organismus beeinträchtigen, deren Wirkungen durch Gabe eines oder mehrerer gewöhnlicher Metaboliten aber wieder aufhebbar sind.

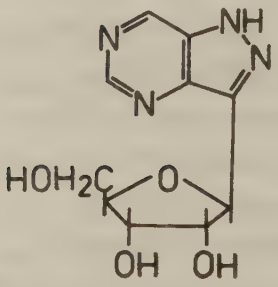
Obwohl Antimetaboliten ihre Aktivität nur auf definiertem Medium zeigen, haben sie doch Bedeutung und Anwendung in Biologie und Medizin gefunden (8). So dienen z.B. Antivitamine zum Erzeugen gezielter Avitaminosen und vermitteln somit Einblicke in verschiedene intermediäre Stoffwechselwege. Aminopterin und Methotrexat, Antivitamine der Folsäure, finden Einsatz bei der Therapie gewisser Leukämieformen.

Tab. 1: Beispiele für Antimetaboliten aus Mikroorganismen



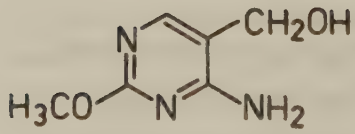
Aminosäure-Antimetabolit

Phosphinotricyl-alanyl-alanin (9)



Nucleosid-Antimetabolit

Formycin (10)



Vitamin-Antimetabolit

Bacimethrin (11)

1.2. PROBLEMSTELLUNG

Bei einem Screening der Firma Thomae (Biberach) fiel mit dem Stamm Streptomyces venezuelae ssp. xanthophaeus der Produzent eines Antibiotikums gegen gramnegative Keime auf. Da diese Aktivität mit α-Tocopherolacetat aufhebbar war, wurde die Wirksubstanz gemäß der Definition von PRUESS und SCANNELL (7) als Vitamin E-Antagonist eingestuft. Da bisher ein solcher Antagonismus noch nicht beschrieben wurde, sollte in dieser Arbeit die wirksame Verbindung aus dem Kulturfiltrat isoliert, in ihrer Struktur aufgeklärt und in ihren Eigenschaften untersucht werden.

2. AUFREINIGUNG UND ISOLIERUNG

2.1. Vorversuche

Die ersten Untersuchungen sollten es ermöglichen, den Wirkstoff in eine chemische Stoffklasse einzuordnen. Durch spezifische Nachweismethoden kann dann der Gang der Isolierung verfolgt und die Leistung einzelner Anreicherungsschritte abgeschätzt werden. Ferner sollten charakteristische Eigenschaften des Wirkstoffes ausgetestet und damit Möglichkeiten für weitere Reinigungsschritte erarbeitet werden.

2.1.1. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen

In den Chromatogrammen des eingeengten Kulturfiltrats fanden sich eine Vielzahl farbiger und mit verschiedenen Sprühreagenzien (12) anfärbbarer Verbindungen. Parallel durchgeführte Bioautographien zeigten jedoch keine Korrelation zwischen so detektierten Substanzen und biologischer Aktivität. Nur mit Hilfe der biologischen Detektionen konnten Laufmittelsysteme entwickelt werden, die eine Auftrennung in mehrere biologisch aktive Komponenten ermöglichten. Bei diesen Komponenten handelte es sich um sehr polare Verbindungen (Tab.2).

Tab. 2: R_F-Werte der Wirkstoffe in Bioautogrammen

DC-System / R_F	I	II	III	IV
	0.15	0.12	0.03	0.07
	0.21	0.16		0.13
	0.2-0.4			0.22
				0.27

2.1.2 Stabilitätstests

Lyophilisiertes Kulturfiltrat wurde bis zu 5 h in Wasser bei verschiedenen pH-Werten und unterschiedlichen Temperaturen auf seine Stabilität in Lösung untersucht (Tab.3).

Tab. 3: Stabilitätstest in Lösung über 5 h

Lösungsmittel	Temperatur (°C)	biologische Aktivität (%)
Kontrolle[x)]	-30	100
Wasser	20	100
Wasser	60	98
Wasser	110	0
6 N HCl	20	52
6 N HCl	60	48
15 N NH_3	20	100
15 N NH_3	60	100

x) Der Kontrollansatz wurde in Wasser bei -30°C unter Lichtausschluß aufbewahrt.

2.1.3. Isoelektrische Fokussierung

Nach Gelelektrofokussierung (13) des lyophilisierten Kulturfiltrats fanden sich die biologisch aktiven Komponenten in den Fraktionen mit isoelektrischen Punkten zwischen pK 8.3 und 8.6.

2.1.4. Extraktionsversuche

Häufig angewandte Anreicherungsmethoden, wie z.B. die Soxhlet-Extraktion, waren aufgrund der Temperaturempfindlichkeit und Polarität der Antimetaboliten nicht anwendbar. Dagegen war die Extraktion von biologisch aktiver Substanz aus dem Lyophilisat des Kulturfiltrats mit 1-Butanol, Methanol und Wasser gut möglich.

2.1.5. Verteilungsverhalten

Der Wirkstoff ließ sich aus alkalischer wässriger Lösung mit 1-Butanol extrahieren, nicht dagegen aus neutralen oder sauren Lösungen.

2.1.6. Multiplikative Verteilungsverfahren

Da die Wirkstoffe aus wässriger Lösung mit 1-Butanol extrahiert werden konnten, waren Verfahren der multiplikativen Verteilung bei der Aufreinigung anwendbar. Die bewährte CRAIG-Verteilung (14) war dabei durch ihre hohe Belastbarkeit und Selektivität der neu entwickelten "Rotation Locular Countercurrent Chromatography" (RLCC) (15) (Zinsser, Frankfurt) eindeutig überlegen. Die RLCC-Methode erfordert aufgrund der Vorversuche offensichtlich bereits weitgehend vorgereinigte Verbindungen.

2.1.7. Chromatographische Trennungen

Zur Auftrennung polarer Stoffe sind Ionenaustausch-, Adsorptions- und Gelchromatographie geeignet. In dieser Reihenfolge nehmen Beladbarkeit und Trennvermögen dieser Methoden ab. Da zu Beginn der Anreicherung große Stoffmengen vorlagen, empfahlen sich für erste Konzentrierungsschritte schnelle Methoden, die hohen Stoffumsatz ermöglichen, wie z.B. die Ionenaustauschchromatographie. Beim Einsatz des stark sauren Kationenaustauschers Dowex 50 x 8 (Serva, Heidelberg) stellte sich aber heraus, daß durch stets noch vorhandene Adsorptionseffekte irreversible Bindungen zwischen Wirkstoff und Harz auftraten. Auch bei schwächer sauren Phasen wie z.B. CM Sephadex (Pharmacia, Freiburg) waren die Aktivitätsverluste noch so hoch, daß auf einen weiteren Einsatz von Ionenaustauschern verzichtet wurde.

Erste Fortschritte brachte die Adsorptionschromatographie an Amberlite XAD 4 (Serva, Heidelberg). Lyophilisat des Kulturfiltrats wurde adsorbiert, mit Wasser gewaschen und mit 50%igem wässrigen Methanol eluiert. Andere Adsorbentien wie Kieselgel und Aktivkohle wiesen selbst nach Desaktivierung noch starke Chemisorption auf, so daß zu große Verluste auftraten.

Die Gelchromatographie wird zwar vorwiegend zur Auftrennung nach Molekülgröße benutzt, die Anwesenheit von Carboxy-Gruppen (ca. 0.1 mval/g) im Säulenmaterial kann jedoch auch

zur Auftrennung niedermolekularer Stoffe genutzt werden (16). Arbeitet man in sehr verdünnten Puffern, so werden diese zusätzlichen Ionenaustauscher-Eigenschaften verstärkt. Damit wurde die Chromatographie der Wirkstoffe an Sephadex G 15 (Pharmacia, Freiburg) zu einer leistungsfähigen Anreicherungsmethode, die sich durch milde Trennbedingungen, gute Reproduzierbarkeit und minimalen Substanzverlust auszeichnete.

Bei der Entwicklung einer effektiven Weiterreinigungsmethode verschaffen Trennungen mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) raschen Überblick. Durch kurze Analysenzeiten und gute Auflösung können Trennbedingungen geändert und unterschiedliche Phasen getestet werden. Trennversuche wurden an Umkehrphasen (Lichrosorb RP-8 und RP-18, Merck), an Ionenaustauscher (CM Sephadex, LKB) und Aminphasen (Lichrosorb-NH_2, Merck, sowie μ-Bondapak-NH_2, Waters) unternommen. Dabei wurden an Aminphasen die besten Resultate erzielt. Eine refraktometrische und spektroskopische Detektion war zu diesem Zeitpunkt noch nicht möglich. Zur Detektion wurden daher Bioautogramme der Fraktionen angefertigt.

2.1.8. Ergebnisse der Voruntersuchungen

Die Voruntersuchungen ergaben Hinweise, daß es sich bei dem Antibiotikum um ein Gemisch mehrerer Wirkkomponenten handeln mußte. Der ionische Charakter dieser polaren, basischen Substanzen (pK 8.3-8.6) konnte wegen zu starken

Wechselwirkungen nicht zur Trennung an Ionenaustauschern ausgenutzt werden. Dagegen konnten durch Adsorptionschromatographie große Mengen unpolarer Begleitstoffe und durch anschließende multiplikative Verteilung und Gelchromatographie vor allem polare Verbindungen und Salze abgetrennt werden.

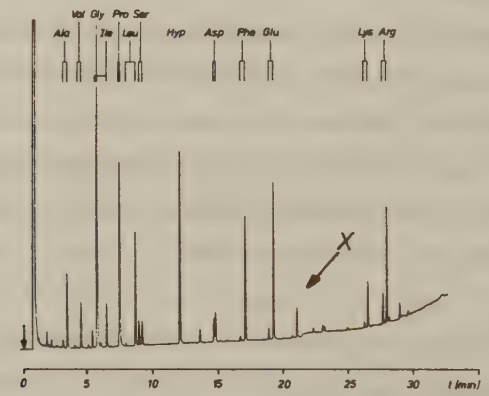
Pilotuntersuchungen mit HPLC an Aminsäulen zeigten Möglichkeiten zur Trennung der Einzelaktivitäten auf. Eine Bestimmung der Wirkstoffe war nur anhand biologischer Tests wie Bioautogramm und Plattendiffusionstest möglich. Da die Antibiotika weder refraktometrisch noch spektroskopisch detektierbar waren, konnten nur minimale Konzentrationen hochaktiver Wirkstoffe vorliegen.

Im Rahmen der Vorversuche wurden so aus 30 Fermenteransätzen etwa 1000 l Kulturfiltrat aufgearbeitet. Trotz Erfolgen bei der Ausbeutesteigerung durch Optimierung der Fermentation konnten daraus nur etwa 50 mg Rohprodukt isoliert werden.

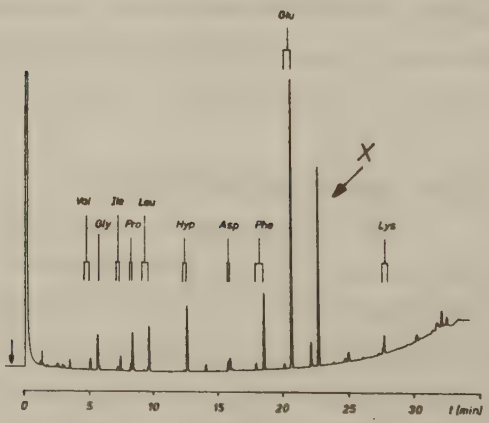
2.2. Erste Charakterisierung der Wirkstoffe

Mit zunehmendem Reinheitsgrad zeigte das hydrophile Wirkstoffgemisch Peptideigenschaften, die seine präparative Trennung von den im Medium (siehe Experimenteller Teil) vorhandenen großen Mengen an Oligopeptiden und Aminosäuren erheblich erschwerten. Der geringe Wirkstoffgehalt führte

zu Problemen bei der bereits begonnenen chemischen Charakterisierung: Detektion durch Sprühreagenzien wie Ninhydrin und Chlor/TDM-Reagens war durch Überlagerung vieler Substanzen nicht eindeutig. Die Auswertung der Resultate bei Massenspektroskopie und NMR-Untersuchungen war schwierig und in der Aminosäureanalyse störte ein stets vorhandenes Untergrundspektrum von Proteinaminosäuren.



(a)



(b)

Abb. 1: Gaschromatographische Trennung der N-Pentafluorpropionyl-DL-aminosäure-propylester an der chiralen Phase L-Valin-tert. butylamid-polysiloxan (Chirasil-Val) (17,18)

Trotz dieser Schwierigkeiten gelang es, einen Hinweis auf eine Strukturkomponente des Antibiotikums zu erhalten: Im Totalhydrolysat fand sich eine Nichtproteinaminosäure. Die im Laufe der Anreicherung erfolgte Zunahme dieser durch Aminosäureanalyse und Gaschromatographie auch quantitativ bestimmbaren Komponente X (Abb.1) korrelierte eindeutig mit der biologischen Aktivität der jeweiligen Probe. Die Gaschromatogramme a und b (Abb.1) zeigen die im Totalhydrolysat antibiotisch aktiver Fraktionen enthaltenen Aminosäuren; a und b sind nach zunehmendem Reinheitsgrad geordnet.

Aus der GC/MS-Untersuchung (Abb.2) ergab sich die Struktur dieser Aminosäure als L-Homophenylalanin (L-2-Aminophenylbutansäure, Molmasse ber. 367).

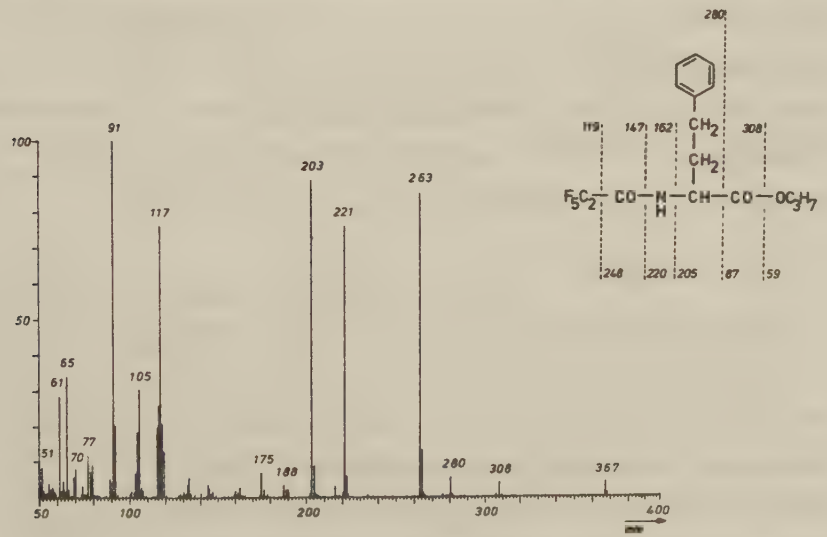


Abb. 2: Massenspektrum der als N-Pfp-Aminosäure-n-propylester derivatisierten Nichtprotein-Aminosäure aus dem Totalhydrolysat von antibiotisch aktiven Fraktionen

Die gaschromatographische Bestimmung von Homophenylalanin bot zum ersten Mal eine empfindliche, nicht biologische Methode zur Detektion der antibiotischen Wirkstoffe.

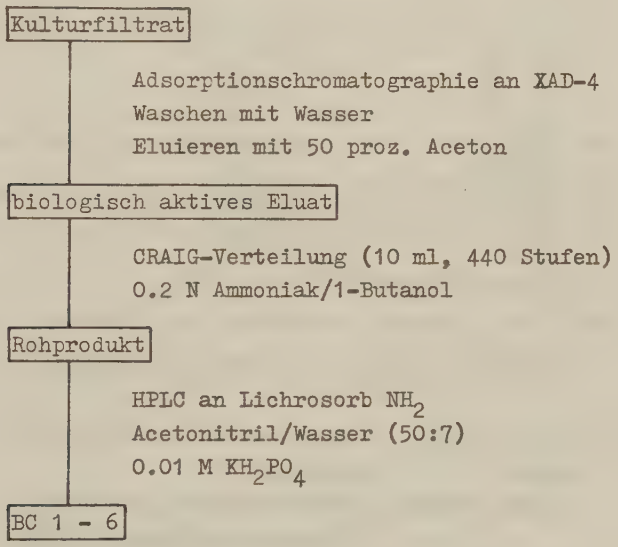
2.3. Entwicklung eines geeigneten Fermentationsmediums

Die peptidische Natur der Wirkstoffe, die aus dem Fleischextrakt-Malz-Medium stammenden Begleitbestandteile und Salze, sowie die außerordentlich geringe Wirkstoffkonzentration erzwangen eine Umstellung der Fermentation. Variation der Nährstoffe wie z. B. Hydrolyse des Fleischextrakts und Ersatz des Malzmediums durch Glycerin/Glukose-Lösung führte neben einer befriedigenden Produktion zu vereinfachten Aufreinigungsbedingungen. Schließlich fand POETSCH (19) die Zusammensetzung eines Minimalmediums (siehe Experimenteller Teil), bei dem ganz auf Aminosäuren als Stickstoffquelle verzichtet werden konnte. Damit war bei gleichzeitiger Steigerung der Wirkstoffkonzentration die Produktion eines geeigneten Rohprodukts gelungen.

2.4. Aufarbeitung von Kulturfiltrat eines 20 l-Minimalfermenters

Ziel dieser Aufreinigung war es, das Wirkstoffgemisch in einzelne Komponenten aufzutrennen und ausreichende Mengen für die Strukturaufklärung der Wirkstoffe bereitzustellen.

Der erste Konzentrierungsschritt erfolgte durch Adsorption von Kulturfiltrat an Amberlite XAD-4 und anschließender Elution mit 50prozentigem wässrigen Aceton (Schema 1). Nach weiterer Anreicherung mittels CRAIG-Verteilung lag ein Rohprodukt vor, das durch HPLC an einer Aminphase einer Feinreinigung unterzogen wurde (Abb.3).



Schema 1: Isolierung der Antibiotika

Die Chromatographiebedingungen konnten so gewählt werden, daß die Elution der Antibiotika-Komponenten spektroskopisch verfolgt werden konnte (UV bei 210 nm). Durch diese HPLC-Trennung konnten sechs unterschiedliche Wirkstoffe isoliert werden, die im folgenden als BC 1 bis BC 6 bezeichnet werden (Abb.3).

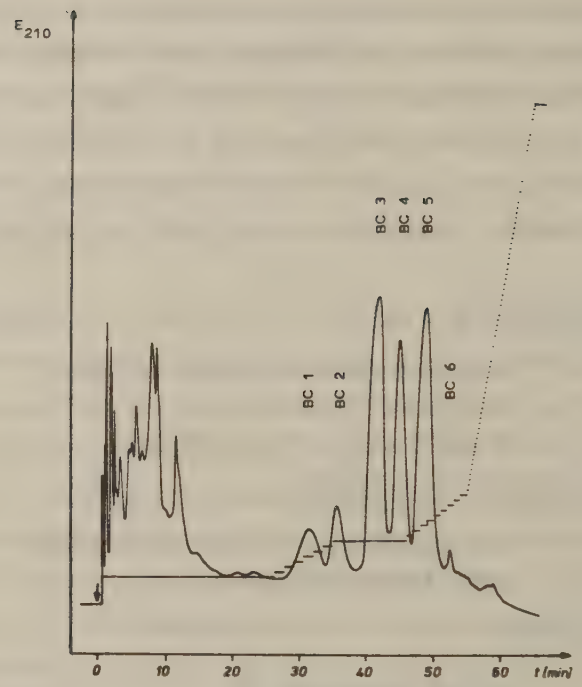


Abb. 3: HPLC-Trennung der Wirkstoffe BC 1 bis BC 6.

Säule: Lichrosorb NH_2

Mobile Phase: A: 0.01 M KH_2PO_4

B: Acetonitril/Wasser (50:7)

Gradient:

Zeit (min)	% A	% B
0	8	92
25	8	92
35	15	85
45	15	85
55	25	75
65	100	0
70	100	0

Fließgeschwindigkeit: 1.5 ml/min

Die durch präparative HPLC erhaltenen Präparate lagen in allen Systemen dünnschichtchromatographisch einheitlich vor. Eine Detektion war bei den nun vorliegenden Mengen mit Ninhydrin und mit Chlor/TDM-Reagenz möglich. Im Laufmittelsystem I konnten die sechs Komponenten auch dünnschichtchromatographisch aufgetrennt werden:

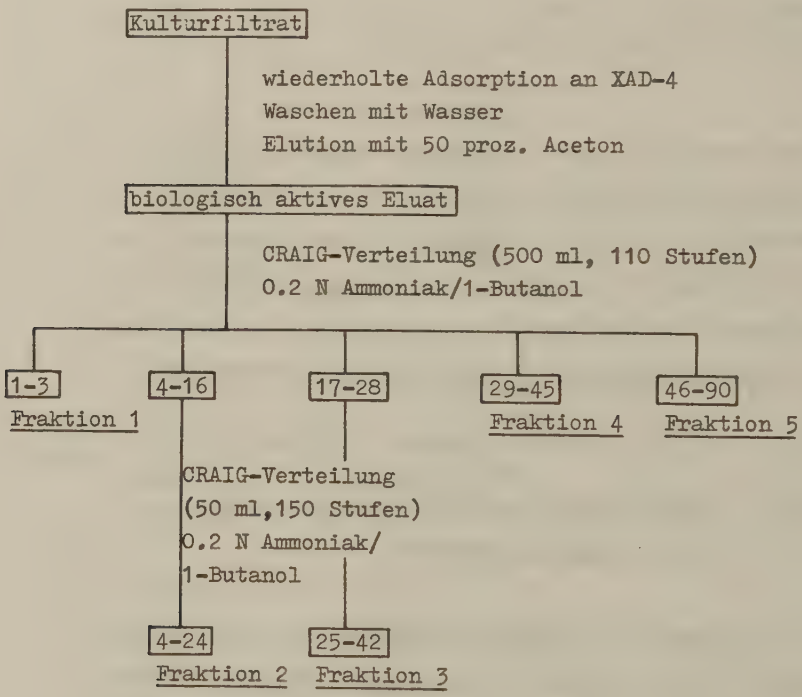
Wirkstoff	BC 1	BC 2	BC 3	BC 4	BC 5	BC 6
R_F (I)	0.29	0.23	0.20	0.16	0.13	0.10

Durch wiederholte HPLC-Trennungen konnten die für eine Strukturaufklärung mit empfindlichen spektroskopischen Methoden erforderlichen Mengen an Reinverbindungen isoliert werden. Um die für weiterführende biologische und chemische Untersuchungen benötigten Mengen zu erhalten, wurde ein präparativer Aufreinigungsgang entwickelt:

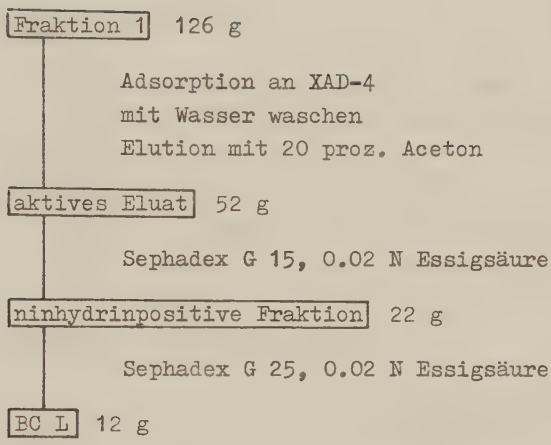
2.5. Aufarbeitung des Kulturfiltrats von vier 200 l- Minimalfermentern

Die Anreicherung des Kulturfiltrats erfolgte durch zweimalige Adsorption an XAD-4 und übliche Elution vom Harz. Weitergereinigt wurde mittels CRAIG-Verteilung. Daraus resultierten fünf Unterfraktionen, die gesondert aufgearbeitet wurden (Schema 2-7). Da die Produktion von Gramm-Mengen an einzelnen Komponenten nicht mit der kostenintensiven HPLC-Methode durchgeführt werden sollte,

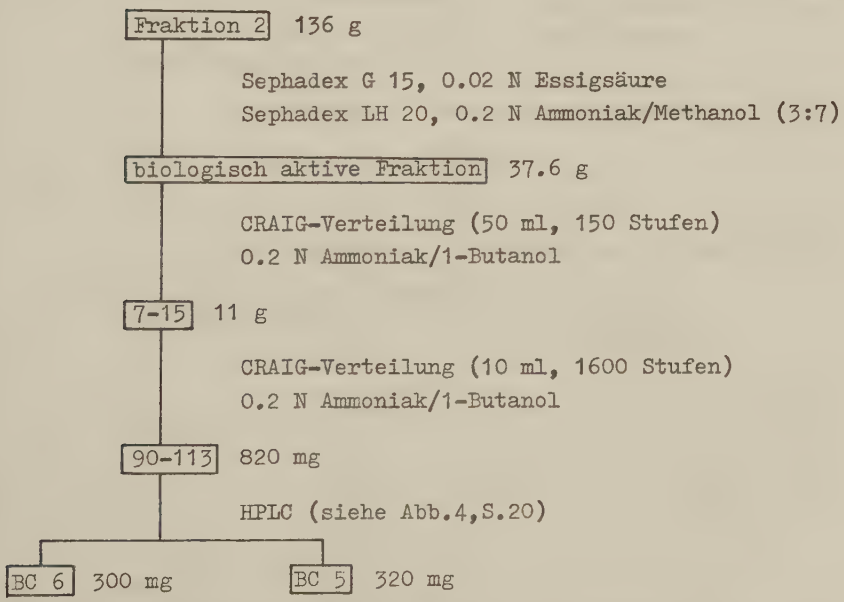
wurden mit der Gelchromatographie und erneuter CRAIG-Verteilung Methoden eingesetzt, die für eine Feinreinigung zwar sehr zeitaufwendig waren, aber die hohen Anforderungen an Reinheit und Beladbarkeit erfüllen konnten. Als letzter Reinigungsschritt wurden einzelne Wirkstoffe noch umkristallisiert.



Schema 2: Fraktionierung des Kulturfiltrats aus insgesamt vier 200 l-Fermentern.
Die Zahlen entsprechen den Nummern der Verteilungselemente.



Schema 3: Aufarbeitung von Fraktion 1: Isolierung von BC L (L = large).



Schema 4: Aufarbeitung von Fraktion 2: Isolierung von BC 5 und 6.

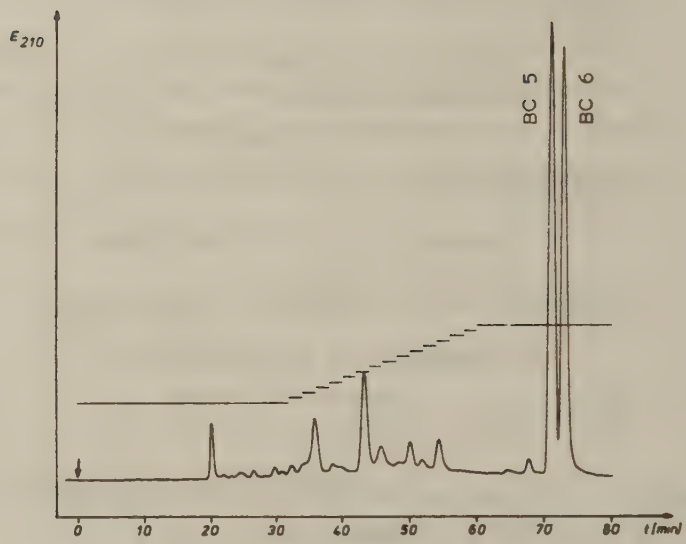


Abb. 4: HPLC-Trennung von BC 5 und 6 aus Fraktion 2

Säule: Lichrosorb NH_2

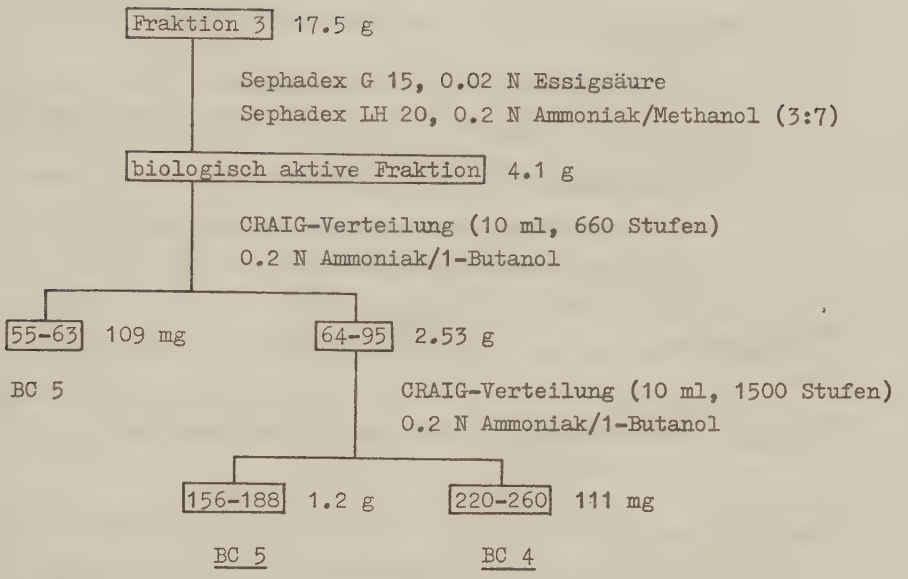
Mobile Phase: A: 0.01 M KH_2PO_4

B: Acetonitril/Wasser (50:7)

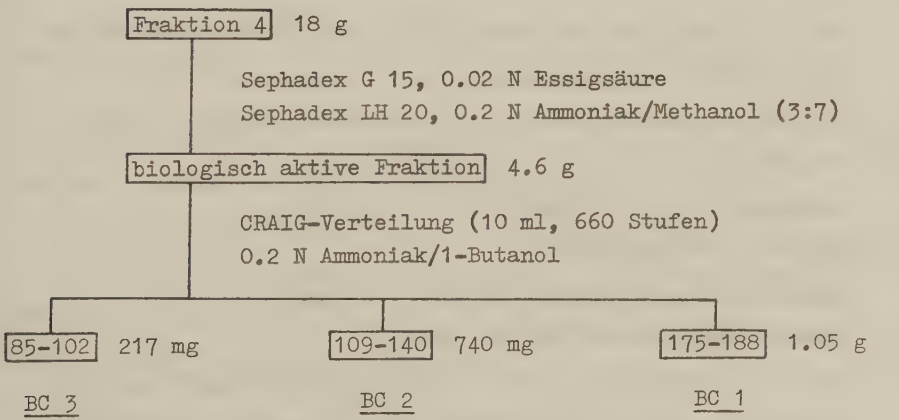
Gradient:

Zeit (min)	% A	% B
0	15	85
30	15	85
60	30	70
80	30	70

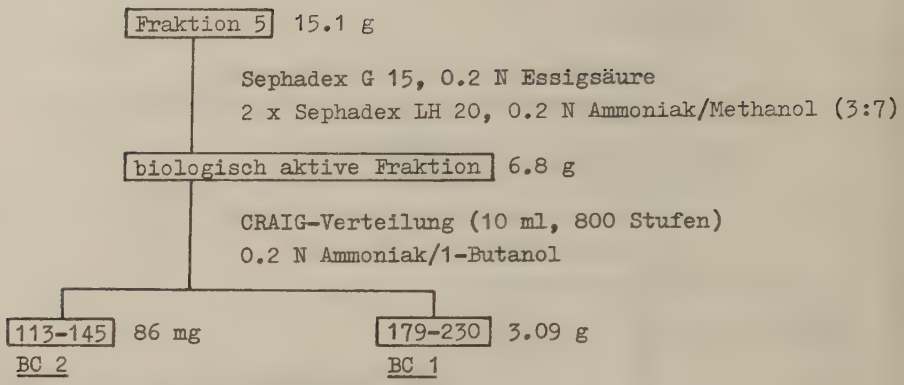
Fließgeschwindigkeit: 1,5 ml/min



Schema 5: Aufarbeitung von Fraktion 3: Isolierung von BC 4 und BC 5



Schema 6: Aufarbeitung von Fraktion 4: Isolierung von BC 1, BC 2 und BC 3.



Schema 7: Aufarbeitung von Fraktion 5: Isolierung von BC 1 und BC 2

3. CHARAKTERISIERUNG DER WIRKSTOFFE

3.1. Spektroskopische Methoden zur Strukturaufklärung niedermolekularer Verbindungen

Zum Zeitpunkt der Strukturaufklärung lagen von den einzelnen Naturstoffen Mengen zwischen 8 und 25 mg vor. Zur Strukturbestimmung dieser geringen Substanzmengen wurden vor allem folgende spektroskopische Methoden eingesetzt:
Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR),
Massenspektroskopie (MS),
Infrarotabsorptionsspektroskopie (IR) und
Elektronenspektroskopie (UV, VIS).
Da ein Großteil der in dieser Arbeit berichteten Strukturaufklärungen mittels NMR-Untersuchungen erfolgte, soll kurz auf die hierbei eingesetzten Aufnahmetechniken eingegangen werden.

3.1.1. ^{13}C-NMR-Spektroskopie

Diese Methode war lange wegen ihrer Unempfindlichkeit und dem dadurch für eine Messung benötigten großen Substanzbedarf (circa 5 mg pro erwartetes ^{13}C-Signal) häufig nicht einsetzbar. Durch technische Weiterentwicklungen wie die Einführung der Impuls-Fourier-Transform-Technik und die Verwendung supraleitender Magnete hoher Feldstärke ist es heute möglich, ^{13}C-NMR-Spektren auch von Verbindungen zu erhalten, die in nur kleinen Mengen zur Verfügung stehen. (circa 100 µg pro erwartetes ^{13}C-Signal).

Die empfindlichste ^{13}C-NMR-Aufnahmetechnik ist das Verfahren der Protonen-Breitbandentkopplung. Die hierbei erzielten Signalintensitäten und die erhebliche Vereinfachung von Spektren beruht darauf, daß alle auf ^{13}C-^{1}H-Kopplungen zurückgehenden Multipletts zu Singuletts zusammenfallen. Der Informationsverlust der Signalmultiplizitäten wird oft durch den erreichten Empfindlichkeitsgewinn und die erleichterte Bestimmung chemischer Verschiebungen wieder aufgewogen.

Die Information über die Signalmultiplizitäten - Dublett, Triplett und Quartett für Methin-, Methylen- und Methylkohlenstoffatome - liefert die "Off-Resonance"-Meßmethode. Durch dieses Entkopplungsverfahren werden ^{13}C-^{1}H-Kopplungen über eine Bindung sichtbar. Dazu werden größere Substanzmengen und längere Meßzeiten benötigt.

Eine alternative Technik, das J-modulierte Spin-Echo-Experiment, liefert Spektren hoher Peakintensität mit ähnlichen Informationen wie ein "Off-Resonance"-Spektrum. Mittels dieser Technik werden sekundäre und quartäre Kohlenstoffatome mit negativer, primäre und tertiäre C-Atome mit positiver Amplitude dargestellt. Ein Intensitätsverlust der Signale durch Multiplettbildung wie beim "Off-Resonance"-Verfahren wird dadurch vermieden.

3.1.2. ^{1}H-NMR-Spektroskopie

Die Aufnahme von ^{1}H-NMR-Spektren in Magnetfeldern hoher Feldstärke hat die Aussagekraft dieser Methode stark verbessert. Lagen bei Messungen der isolierten Wirkstoffe am 90 MHz-Spektrometer noch komplexe Multipletts vor, so waren diese bei 400 MHz besser aufgelöst.

Hochaufgelöste Spektren ermöglichten eine eindeutige Zuordnung der Signale. Zudem waren durch Auswertung von Kopplungskonstanten aufgrund deren Abhängigkeit von sterischen Faktoren Aussagen über die Konfiguration der Wirkstoffe möglich.

3.1.3. Doppelresonanz-Experimente

Multipletts entstehen durch Spin-Spin-Kopplungen magnetisch nicht äquivalenter Kerne. Zur Bestimmung der an einer Multiplettbildung beteiligten Kopplungspartner wird die Resonanzfrequenz des zu untersuchenden Kerns eingestrahlt. Dadurch wird eine

vollständige Spinentkopplung dieses Kerns erreicht, wodurch sich alle Multipletts vereinfachen, an deren Bildung der untersuchte Kern beteiligt war.

Man nennt diese Art der Spektroskopie, bei der gleichzeitig mit unterschiedlicher Frequenz eingestrahlt wird, Doppelresonanz-Spektroskopie.

In einem homonuklearen Doppelresonanz-Experiment können mit dieser Methode Zusammenhänge von ^{1}H-Kernresonanzen aufgezeigt werden. Selektive Entkopplung (single frequency decoupling, SFD) der zu analysierenden Protonen führt zu deren Signalauslöschung. Zusätzliche Veränderungen der Multiplizität anderer Signale beweisen eine Wechselwirkung mit der untersuchten Protonenart.

Das heteronukleare Doppelresonanz-Experiment erlaubt die Aufhebung der auf diese Protonen zurückgehenden ^{13}C-^{1}H-Kopplungen. Durch Einstrahlen der zu analysierenden Protonenresonanzfrequenz hat man eine Zuordnungsmöglichkeit zur Hand: Das direkt an diese Protonen gebundene Kohlenstoffatom erscheint dann als Singulett. Für die übrigen ^{13}C-Kerne bestehen "Off-Resonance"-Bedingungen.

3.2. Charakterisierung des gemeinsamen Grundkörpers von BC 1 bis 6

Mehrere Hinweise führten zu der Annahme, daß den isolierten Wirkstoffen grundlegende Strukturmerkmale gemeinsam sein könnten: zum einen ließ die biologisch einheitliche Wirkung der Verbindungen BC 1 bis 6 eine nahe Verwandtschaft erwarten. Zum anderen sprachen übereinstimmende, charakteristische Protonen- und ^{13}C-Signale von Kernresonanzspektren der Antibiotika für einen gemeinsamen Grundkörper.

3.2.1. ^{13}C-NMR-Spektren

Ein systematischer Vergleich der ^{13}C-NMR-Spektren aller Antimetaboliten führte zu folgenden ^{13}C-Resonanzen, die sowohl in ihren chemischen Verschiebungen als auch in ihrer Multiplizität übereinstimmten:

Tab. 4: ^{13}C-NMR-Daten des gemeinsamen Grundkörpers von BC 1 - 6 (δ (ppm); in D_2O)

	BC 1	BC 2	BC 3	BC 4	BC 5	BC 6	Zuordnung[x]
δ (ppm)	31.2	31.2	30.6	30.6	30.4	30.1	CH_2
	22.1	32.3	32.1	32.3	32.0	31.9	CH_2
	37.3	37.4	37.0	37.3	37.0	36.9	CH
	47.8	47.8	47.4	47.7	47.3	47.2	CH
	57.8	58.5	58.4	57.5	57.1	56.6	CH
	123.5$^+$	123.1$^+$	123.1$^+$	123.3	123.7$^+$	123.3$^+$	CH
				123.4			CH
	138.0$^+$	138.5$^+$	137.9	138.2	137.6$^+$	137.6$^+$	CH
			137.9	138.3			CH
	180.6	180.5	180.3	180.3	180.0	180.7	C=O

Legende zu Tab. 4:

x) die Zuordnung erfolgte aus "Off-Resonance"- bzw. Spin-Echo-Messungen

+) doppelte relative Intensität der ^{13}C-Resonanzen

3.2.2. ^{1}H-NMR-Spektren

Die in Tab. 4 zusammengefassten ^{1}H-chemischen Verschiebungen fanden sich in allen ^{1}H-NMR-Spektren der Wirkstoffe und wurden daher als Protonensignale eines gemeinsamen Grundkörpers interpretiert:

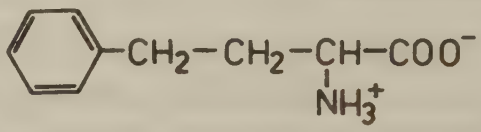
Tab. 5: ^{1}H-NMR-Daten der Wirkstoffe BC 1 - 6 (δ (ppm); in D_2O)

	BC 1	BC 2	BC 3	BC 4	BC 5	BC 6	Integration
δ (ppm)	1.59	1.59	1.59	1.62	1.62	1.65	2 H
	1.73	1.72	1.72	1.75	1.74	1.78	1 H
	1.83	1.82	1.82	1.84	1.83	1.85	1 H
	2.93	2.92	2.92	2.90	2.90	2.92	1 H
	4.22	4.17	4.22	4.15	4.15	4.18	1 H
	4.40	4.41	4.40	4.38	4.37	4.39	1 H
	5.84	5.84	5.84	5.83	5.83	5.85	2 H
	6.12	6.13	6.12	6.12	6.12	6.15	2 H

3.2.3. Aminosäurenanalyse

Das Totalhydrolysat aller Antibiotika (6 N HCl/110 °C/24 h) zeigte in der Aminosäurenanalyse einen hohen Gehalt an Ammoniak und eine weitere, allen Metaboliten gemeinsame, ninhydrinpositive Verbindung. Dieser Bestandteil des Hydrolysats war schon während der Aufreinigung der Wirkstoffe

aufgefallen, da sein Gehalt eine hohe Korrelation zu der biologischen Aktivität der Probe aufwies (vergl. Abschn. 2.2). Anhand von GC/MS-Untersuchungen (siehe S.13) war dieses Hydrolyseprodukt als 2-Amino-4-phenyl-butansäure (HPhe, Homophenylalanin) identifiziert worden:



Mittels STRECKER-Synthese (20) konnte D,L-Homophenylalanin dargestellt werden. Es erwies sich in der Aminosäurenanalyse und in seinem dünnschichtchromatographischen Verhalten als identisch mit dem Antibiotika-Abbauprodukt. Die Enantiomere von N-Pentafluoropropionyl-homophenylalanin-n-propylester konnten gaschromatographisch an der chiralen Phase Chirasil-Val (17,18) getrennt werden. Der Vergleich von synthetisiertem, racemischem Homophenylalanin mit Homophenylalanin aus den Wirkstoffhydrolysaten zeigte, daß diese die Aminosäure stets in der L-Konfiguration enthalten.

Homophenylalanin selbst konnte aber kein Baustein der Antimetaboliten sein, da deren ^{13}C- und ^{1}H-NMR-Spektren keine der charakteristischen Aromatensignale aufwiesen. Bei dieser Aminosäure mußte es sich somit um das Abbauprodukt einer säurelabilen Komponente der nativen Wirkstoffe handeln.

Die Bildung von Homophenylalanin wurde durch unterschiedliche Hydrolyseversuche an BC 1 genauer untersucht. Dabei zeigte sich, daß diese Abbaureaktion schon unter erheblich milderen Bedingungen als denen der sauren Hydrolyse ablief. So bildete sich aus BC 1 bei einer Temperatur von 100 °C in neutralem Wasser ein Homophenylalanin enthaltendes Hydrolyseprodukt.

Abb. 5 gibt die ^{1}H-NMR-spektroskopisch verfolgte Bildung der Phenylgruppe von Homophenylalanin wieder, wie sie an BC 1 beobachtet wurde.

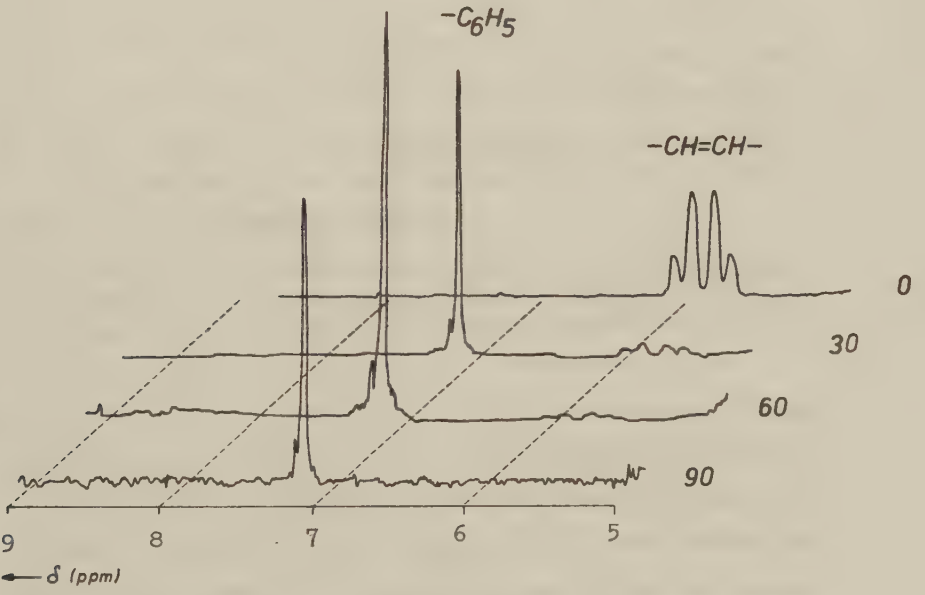


Abb. 5: ^{1}H-NMR-Spektren des Wirkstoffs BC 1 in Wasser, sowie 30, 60 und 90 min nach Einwirkung von Wasser bei 100 °C (pH=7).

Man erkennt, daß in dem Maße, wie das Signal der aromatischen Protonen bei 7.25 ppm wächst, die Signale olefinischer Protonen bei 5.8 - 6.2 ppm verschwinden. Die Kinetik dieser Reaktion (Abb.6) wurde durch quantitative Auswertung der Integration olefinischer und aromatischer Protonen ermittelt.

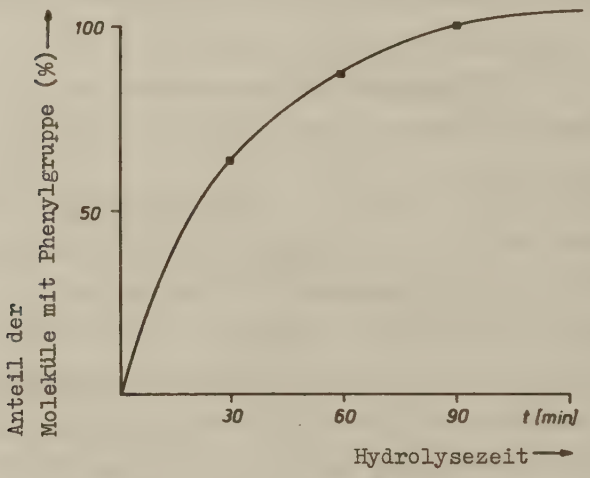
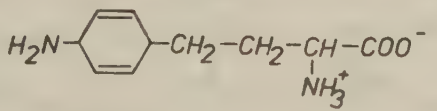


Abb. 6: Zeitlicher Verlauf der Homophenylalanin-Bildung durch Kochen von BC 1 in Wasser ($c=3{,}1 \cdot 10^{-5}$ mol/l).

Der hohe Ammoniakgehalt in jeder Hydrolysatprobe der Antibiotika wies auf eine abspaltbare Aminogruppe als Strukturbestandteil hin. Durch Bestimmung der Konzentrationen von Ammoniak nach unterschiedlicher Art und Dauer der Hydrolyse konnte gezeigt werden, daß nach 90 minütiger Hydrolyse bei 100 °C in Wasser alle Wirkstoffe die Hauptmenge an Ammoniak freigesetzt hatten. Der dabei gebildete Ammoniak war äquimolar zur eingesetzten Ausgangsverbindung. Carbonsäureamide, wie z.B. Glutamin, geben

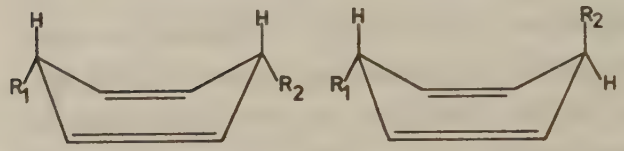
unter diesen milden Bedingungen noch keinen Ammoniak ab. Der zeitgleiche Verlauf der Ammoniak- und Homophenylalaninbildung führte zu der Annahme, daß aus einer hydrolyselabilen Antibiotika-Komponente unter Ammoniak-Eliminierung Homophenylalanin entsteht. Faßt man die spektroskopischen Daten und die Ergebnisse der Hydrolyseuntersuchungen zusammen, so läßt sich die gesuchte Vorstufe von Homophenylalanin wie folgt beschreiben:

Bei dem Grundkörper handelt es sich um ein Molekül, das aus 10 Kohlenstoffatomen besteht. Vier ^{13}C-Signale sind olefinischen Kohlenstoffen zuzuordnen, je zwei bei 123 ppm und zwei bei 138 ppm. Das Signal bei 180 ppm entspricht einer Carbonylresonanz. Die aus "Off-Resonance"-Spektren und Spin-Echo-Experimenten ermittelten Multiplizitäten sprechen für zwei Methylen- und sieben Methin-Kohlenstoffe (Tab. 4). Die so ermittelten 11 Protonen entsprechen der Zahl von Protonen, die sich in ihrer chemischen Verschiebung übereinstimmend, in den ^{1}H-NMR-Spektren aller Wirkstoffe finden (Tab. 5). Bei vier dieser Protonen - je zwei bei 6.1 ppm und 5.8 ppm - handelt es sich um an olefinische Kohlenstoffe gebundene Protonen. Aus ^{13}C- und ^{1}H-NMR-Spektren läßt sich weiterhin ableiten, daß es sich bei dem vorliegenden Olefin um ein symmetrisch substituiertes Dien handeln muß. Diese Befunde wurden zu folgendem Strukturvorschlag zusammengefasst:



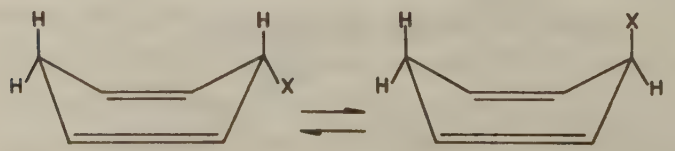
L-2-Amino-4-(4'-amino-2',5'-cyclohexadienyl)-butansäure (L-AACB)

Bei dieser Diaminosäure ist zu beachten, daß neben der L-Konfiguration des C_α-Atoms eine weitere Konfigurationsbeziehung besteht.
Unsubstituiertes Cyclohexa-1,4-dien soll normalerweise in der Boot-Form vorliegen (21). Für 1,4-disubstituierte Cyclohexa-2,5-diene existieren sowohl cis- als auch trans-Formen.



cis-Form trans-Form

Eine Unterscheidungsmöglichkeit bietet die Fernkopplung der 1,4-Protonen dieses 1,4-Dihydrobenzolsystems (22). Für die cis-Form wurde eine Kopplungskonstante $J_{1,4}$ von 11 Hz beobachtet, während trans-Isomere 7.5 Hz zeigten.
Im Falle von 1,4-Dihydrobenzoesäure und 1,4-Dihydrobiphenyl wurde keine unterschiedliche chemische Verschiebung der beiden CH_2-Protonen in 4-Stellung beobachtet. Dieses Verhalten wurde einem Boot-Boot-Gleichgewicht zwischen I und II zugeschrieben:



X = Ph, COOH

I II

Die genaue Stereochemie dieser Verbindungen ist noch nicht bekannt, was an der schwierigen Zugänglichkeit und der großen Aromatisierungstendenz der 1,4-Cyclohexadiensysteme liegt.

Das H_η-Signal des Grundkörpers von Antibiotikum BC 1 weist eine Aufspaltung von 7,5 Hz auf; das stark verbreiterte H_δ-Signal zeigt dagegen keine Aufspaltung. Bei den Antibiotika BC 2, 3 und 4 liegt die Aufspaltung bei 9 Hz, während die entsprechenden Resonanzen bei BC 5 und 6 wegen Überlagerung mit anderen Signalen nicht eindeutig ausgewertet werden konnten. Diese Ergebnisse sprechen für eine trans-Stellung der Substituenten, so daß eine vollständige Beschreibung des Grundkörpers L-2-Amino-4-(trans-4'-amino-2', 5'-cyclohexadienyl-butansäure) lauten müßte.

Diese Formulierung als ungesättigte Diaminosäure steht in Einklang mit allen spektroskopischen Daten. Darüber hinaus erklärt sie die Bildung von Homophenylalanin: Unter Hydrolysebedingungen findet Eliminierung von Ammoniak statt, was zu einer Aromatisierung des Cyclohexadien-Systems führt.

Als weitere Untersuchungen wurden nun zur Überprüfung dieses Strukturvorschlags Doppelresonanz-Experimente und GC/MS-Untersuchungen am intakten Metaboliten BC 1 durchgeführt.

4. STRUKTURAUFKLÄRUNG DER N-METHYLAMINOSÄUREN ENTHALTENDEN ANTIBIOTIKA BC 1, 3 UND 4

Die sechs isolierten Antibiotika wurden anhand struktureller Merkmale in zwei Gruppen eingeteilt. Kennzeichen der ersten Gruppe waren im ^{13}C-NMR-Spektrum charakteristische Signale bei 35 ppm und 70 ppm und das intensive Singulett einer Methylgruppe bei 2,6 ppm im ^{1}H-NMR-Spektrum. Zu dieser ersten Gruppe gehörten die Wirkstoffe BC 1, 3 und 4. Die Antimetaboliten BC 2, 5 und 6, die zur zweiten Gruppe zusammengefaßt wurden, zeigten diese charakteristischen chemischen Verschiebungen nicht.

4.1. Strukturermittlung von BC 1

4.1.1. Aminosäurenanalysen

Nach Totalhydrolyse von BC 1 wies der Aminosäureanalysator Ammoniak und Homophenylalanin als einzige ninhydrinpositive Bestandteile nach.

Die Hydrolyseprodukte wurden daraufhin mit 1-Propanol verestert und dann mit Pentafluorpropionsäureanhydrid acyliert. Die gaschromatographische Analyse an chiraler Phase zeigte neben L-Homophenylalanin weitere Komponenten (Abb.7).

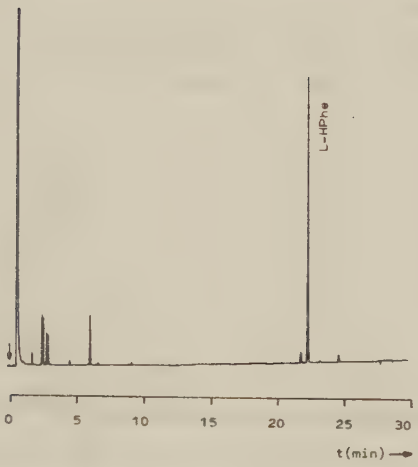


Abb. 7: Gaschromatographische Trennung der N-Pentafluoro-propionyl - aminosäure-n-propylester des Totalhydrolysats von BC 1 an Chirasil-Val.

Der Vergleich dieses Hydrolysats mit einem Testgemisch von D,L-Proteinaminosäuren ergab keine Übereinstimmungen.

4.1.2. NMR-spektroskopische Untersuchung von BC 1

Das ^{1}H-breitbandentkoppelte ^{13}C-NMR-Spektrum von BC 1 (siehe Abb.8) zeigt neben den Signalen, die dem hypothetischen Grundkörper L-AACB zugeschrieben wurden, weitere Resonanzen, die auf eine nahe Verwandschaft zwischen BC 1 und Isoleucin hinwiesen.

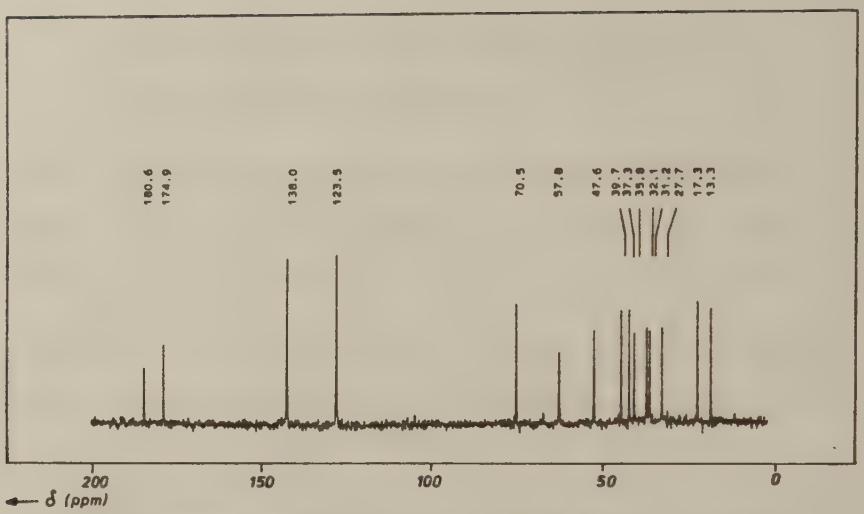


Abb. 8: ^{13}C-NMR-Spektrum von BC 1 (22,628 MHz; 25 °C; D_2O).

In Tabelle 6 sind die ^{13}C-Signale von BC 1 (unter Weglassen der Signale der Cyclohexadienylaminosäure) den chemischen Verschiebungen der Aminosäure Isoleucin gegenübergestellt.

Tab. 6: Vergleich der ^{13}C-NMR-Signale von BC 1 und Isoleucin

δ (ppm)	BC 1	Ile[23)]	Ile[24)]
	174.8	174.8	175.2
	70.5	59.6	60.9
	39.7	36.9	39.7
	35.8	-	-
	27.7	25.4	25.7
	17.3	15.7	15.9
	13.3	11.3	12.5

Diese Analogien finden sich auch beim Vergleich der ^{1}H-NMR-Spektren von BC 1 und Isoleucin wieder (Tab.7).

Tab. 7: Vergleich der ^{1}H-NMR-Signale von BC 1 und Isoleucin

	BC 1		Ile[23]	
δ (ppm)	3.80		3.65	
	2.68	3H	-	
	2.02		1.95	
	1.59			
	1.30		1.29	2H
	1.00	3H	1.00	3H
	0.95	3H	0.94	3H

Im ^{1}H-NMR-Spektrum von BC 1 (Abb.9) fand sich als einziges zusätzliches Signal bei 2.60 ppm das Singulett einer Methylgruppe. Der chemischen Verschiebung zufolge konnte es sich dabei nur um eine O-bzw. N-substituierte Methylgruppe handeln.

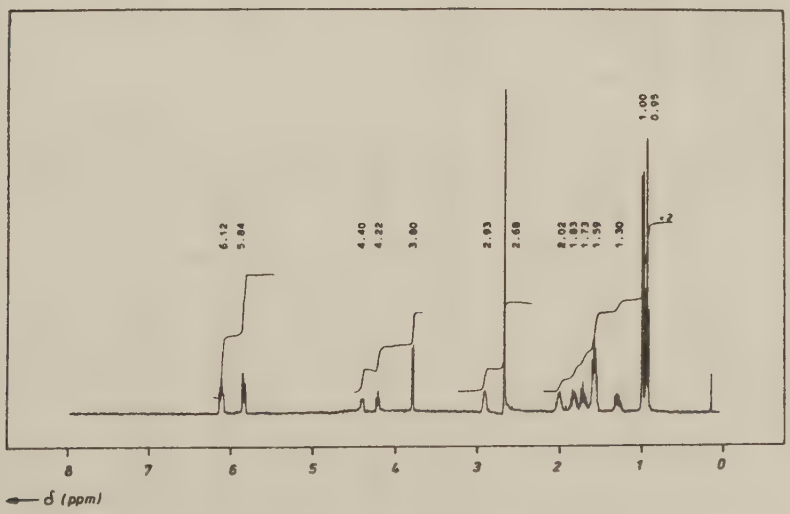


Abb. 9: ^{1}H-NMR-Spektrum von BC 1 (400,13 MHz; 25 °C; D_2O).

4.1.2.1. Doppelresonanzexperimente an BC 1

Zur weiteren Überprüfung der vorgeschlagenen Struktur des Grundkörpers L-AACB und zur restlichen Abklärung von BC 1 dienten folgende homo- und heteronukleare Doppelresonanzexperimente.

In Abbildung 10 sind die ^{13}C-NMR-Spektren von BC 1 wiedergegeben, die sich unter Einstrahlung mit unterschiedlichen Protonenresonanzen ergaben.

Aus diesen Messungen ergeben sich folgende $^{1}H/^{13}C$-Signalzuordnungen:

	SFD	Singulettbildung
δ(ppm)	6.2	138
	5.8	123
	3.3	70
	2.8	37.5

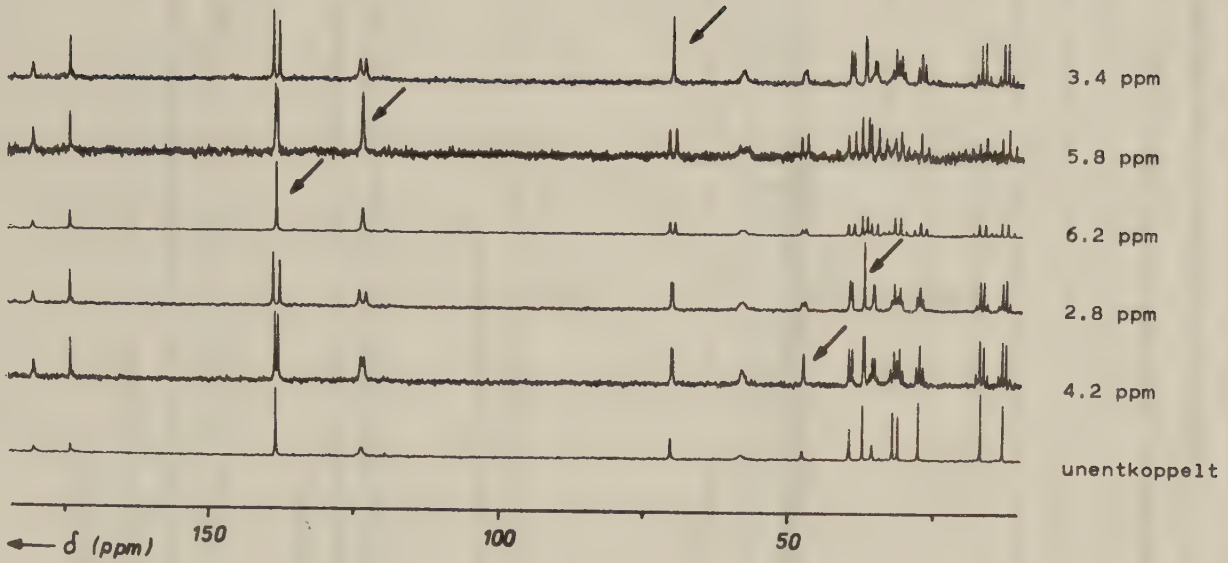


Abb. 10: Doppelresonanzspektren von BC 1
Die ppm-Angaben neben den Spektren geben die eingestrahlten Protonenresonanzfrequenzen an.
Bedingungen: 400.13 MHz; 25 °C; D_2O.

Beim Bestrahlen mit einer 6.2 ppm entsprechenden Resonanzfrequenz ist eine eindeutige Zuordnung der Singulettbildung erst in der vergrößerten Abbildung (Abb.11) erkennbar.

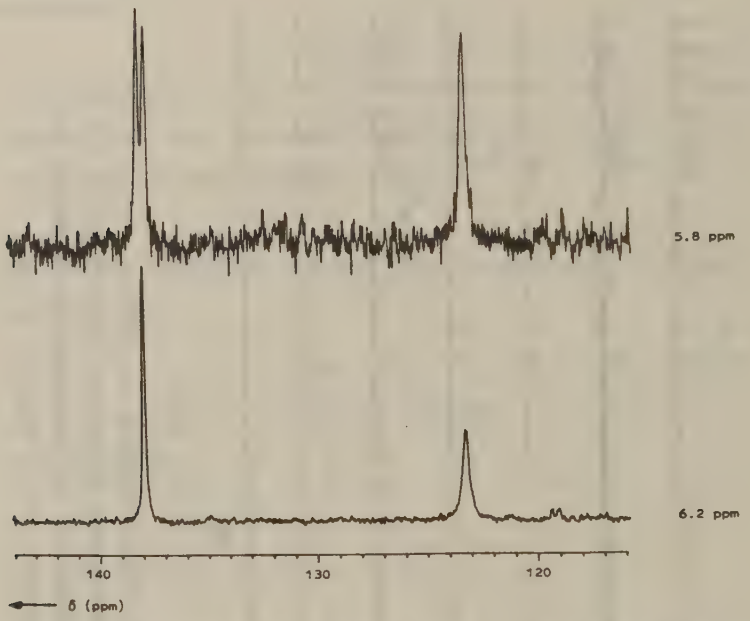


Abb. 11: Gespreizte Ausschnitte der ^{13}C-NMR-Spektren von BC 1 im Olefinbereich 120 - 140 ppm (Doppelresonanz-Experiment).

Das ^{13}C-Signal bei 123 ppm zeigt hier noch eine Dublettaufspaltung. Dagegen wird durch die Frequenzeinstrahlung entsprechend 5.8 ppm das ^{13}C-Signal bei 123 ppm zu einem reinen Singulett entkoppelt.

Keine eindeutige Zuordnung war dagegen durch Einstrahlung der Resonanzfrequenz von 4.2 ppm und 4.4 ppm möglich. Das Dublett bei 47.8 ppm und das bei 57.8 ppm fielen jeweils zu einem Singulett zusammen. Die Ursache ist wohl der geringe Abstand beider Protonensignale. Um eine selektive Entkopplung ausschließlich eines bestrahlten Protons zu erreichen, sollte der Abstand der chemischen Verschiebungen der Protonen mindestens fünfmal den Wert ihrer Kopplungskonstante betragen.

Durch selektive Entkopplung der ^{1}H-NMR-Resonanzen in homonuklearen Doppelresonanz-Experimenten erhielt man ^{1}H-NMR-Spektren von BC 1, die in Abbildung 12 wiedergegeben sind.

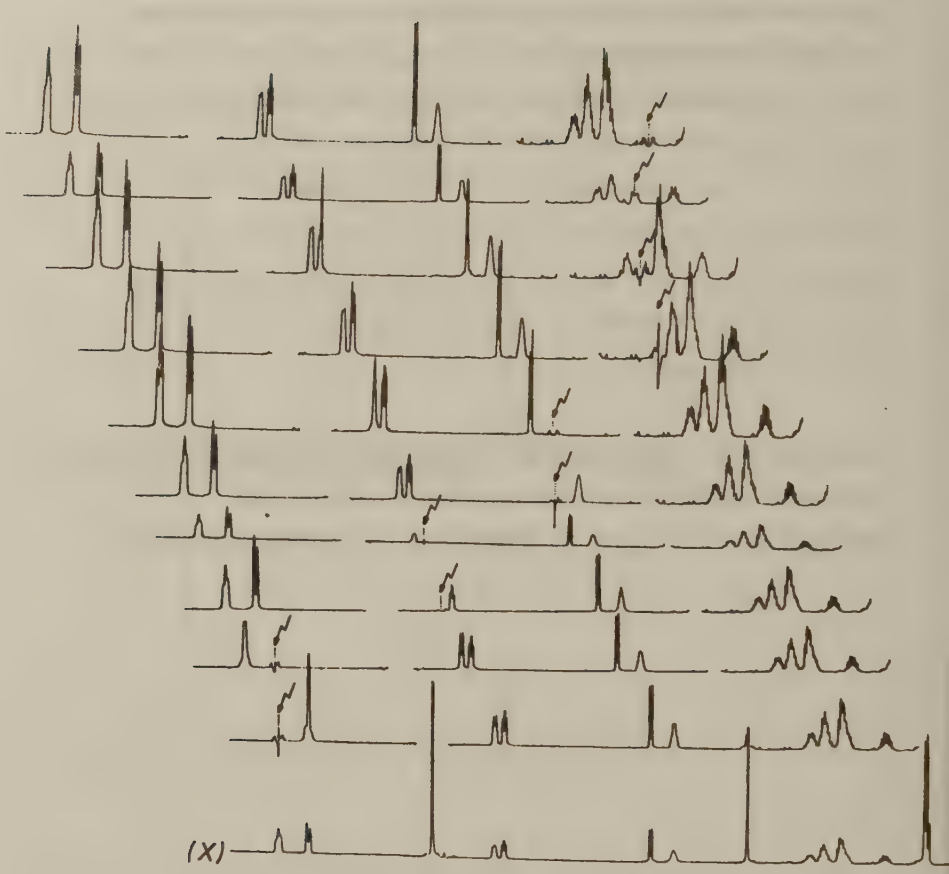


Abb. 12: Entkoppelte Doppelresonanz-Spektren.
(x) nichtentkoppeltes ^{1}H-NMR-Spektrum von BC 1.
Die Signale der N-Methyl- und der C-Methylgruppen sowie die HDO-Resonanz wurden der besseren Übersichtlichkeit halber nicht mit abgebildet.
Die Methylgruppen zeigt gesondert Abb. 13.

Aufgrund der Doppelresonanz-Untersuchungen an BC 1 konnten zwei Teilstrukturen dieses Antibiotikums bestimmt werden. Ein Ergebnis dieser Messungen war die Bestätigung der postulierten Struktur der Aminosäure L-AACB. In Tabelle 8 sind die ^{1}H-Resonanzen aufgeführt, durch deren Einstrahlung die Zugehörigkeit von Protonensignalen zur Teilstruktur des L-AACB aufgezeigt wurde.

Tab. 8: Ergebnisse des homonuklearen Doppelresonanzexperiments. Die Pfeilsymbole geben Auslöschung von ^{1}H-NMR-Signalen wieder, durch +-Zeichen sind Veränderungen der angegebenen Multipletts gekennzeichnet.

SFD (ppm)	Multiplettveränderung (ppm)							
	6.12	5.84	4.40	4.22	2.93	1.83	1.73	1.59
6.12	↙	+	+		+			
5.84	+	↙	+		+			
4.40	+		↙		+			
4.22				↙			+	(+)
2.93	+	+	+		↙			+
1.83				+		↙	(+)	+
1.73				+			↙	+
1.59					+	(+)	(+)	↙

Als zweite Teilstruktur konnte N-Methylisoleucin identifiziert werden. Tabelle 9 gibt die eingestrahlten Resonanzfrequenzen und die dabei beobachteten Multiplettveränderungen wieder.

Tab. 9: Legende siehe Tab. 8, S.43

SFD (ppm)	Multiplettveränderung (ppm)					
	3.80	1.73	1.59	1.30	1.00	0.95
3.80	↙					
1.73	+	↙		+	+	
1.59			↙	+		+
1.30			+	↙		+

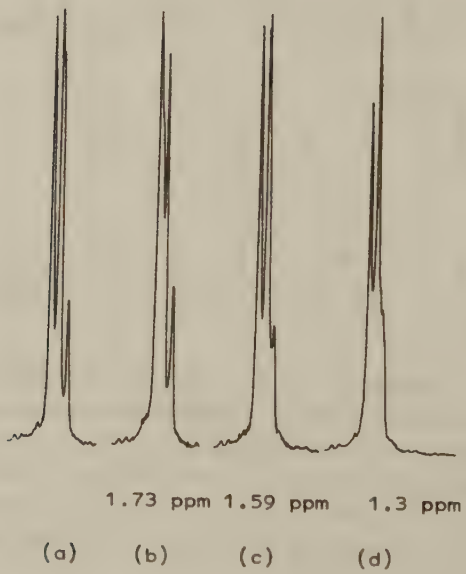


Abb. 13: Vergleich der Methylgruppen aus den Doppelresonanzspektren von BC 1 (siehe Abb. 12, S. 42)
(a) Methylgruppe des nichtentkoppelten Spektrums

Auswirkung auf die Methylgruppen-Signale zeigten die Einstrahlungen der Frequenzen von 1.73 ppm, 1.59 ppm und 1.3 ppm. Abb. 13 zeigt das Zusammenfallen des Methylgruppen-Dubletts beim SFD von 1.73 ppm. Das Triplett wurde beim Einstrahlen von 1.3 ppm zum Singulett und zeigte deutliche Veränderungen bei einer Frequenzeinstrahlung entsprechend 1.59 ppm.

4.1.2.2. NMR-Spektren von N-Methylisoleucin

Die aus NMR-Vergleichsspektren entnommenen chemischen Verschiebungen von N-Methylisoleucin (siehe Abb.14 und 15) entsprachen den bei BC 1 gefundenen Werten.

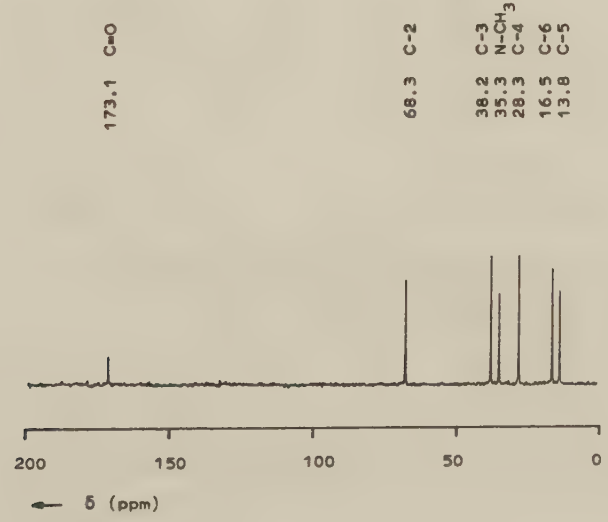


Abb. 14: ^{13}C-NMR-Spektrum von N-Methylisoleucin (D_2O, pH=1; 20,115 MHz; 25 °C)

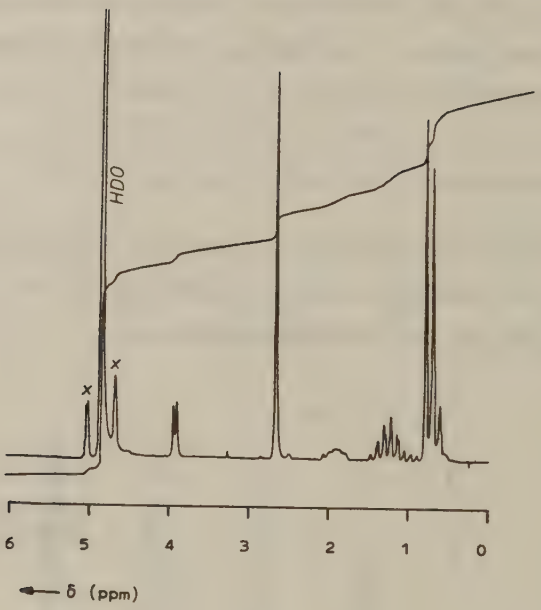


Abb. 15: ^{1}H-NMR-Spektrum von N-Methylisoleucin (D_2O, pH=1; 90 MHz; 25 °C)

4.1.3. Gaschromatographisch-massenspektroskopische Untersuchung des Totalhydrolysats von BC 1

Vollständige Übereinstimmung zeigten auch die gaschromatographischen Analysen von acyliertem und verestertem N-Methylisoleucin und analog derivatisiertem Totalhydrolysat von BC 1 an einer Chirasil-Val-Säule:

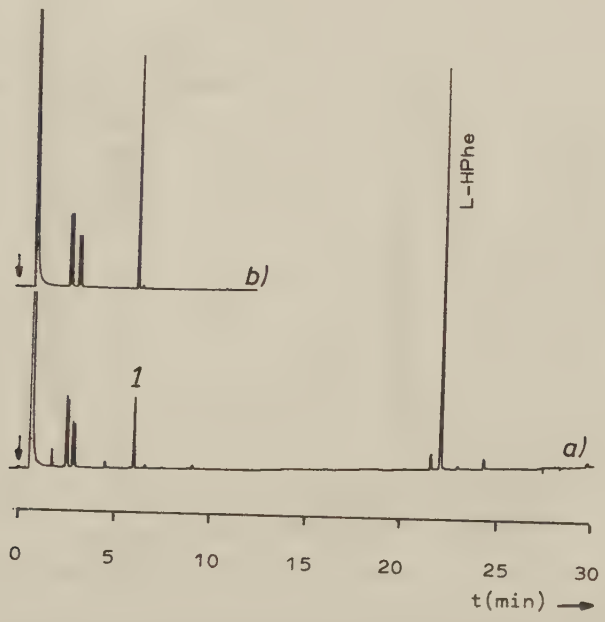


Abb. 16: Gaschromatographische Trennung der N-Pentafluoropropionyl-aminosäure-n-propylester des Totalhydrolysats (a) von BC 1 und (b) von N-Methylisoleucin an Chirasil-Val

Das Massenspektrum von Peak 1 (Abb.16) konnte als N-Methylisoleucin interpretiert werden. Eine Auftrennung von D,L-N-Methylaminosäuren war als N-Pentafluoropropionyl-D,L-N-Methylaminosäure-n-propylester nicht möglich.

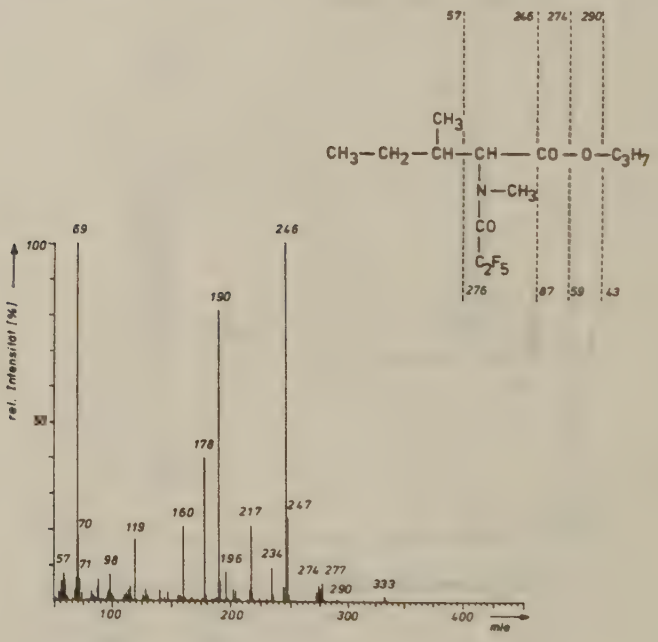


Abb. 17: Massenspektrum des N-Pentafluoropropionyl-N-Methylisoleucin-n-propylester, Molmasse ber. 333 (Peak 1 im Gaschromatogramm, Abb.16, S.47)

Die Zuordnung der Konfiguration gelang nach Umsetzung zum N-Alkyl-ureido-N-alkylamid-Derivat (25). D,L-N-Methyl-aminosäuren lassen sich in dieser Form an einer mit Chirasil-Val belegten Glaskapillare auftrennen. N-Methyl-isoleucin aus BC 1 zeigte das gleiche Retentionsverhalten wie synthetisches N-Methylisoleucin.

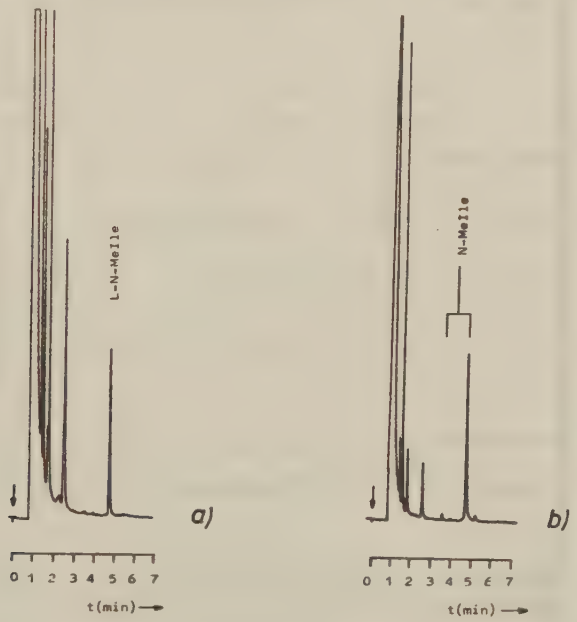


Abb. 18: Auftrennung von N-Methyl-D,L-isoleucin als N-tert. Butyl-ureido-aminosäure-N-tert. butylamid-Derivat aus dem Totalhydrolysat (a) von BC 1 und (b) von L-N-Methylisoleucin.

4.1.4. NMR-Spektren von BC 1

Die vollständige Interpretation der ^{13}C- und ^{1}H-NMR-Spektren ist in Abb. 19 und 20 wiedergegeben.

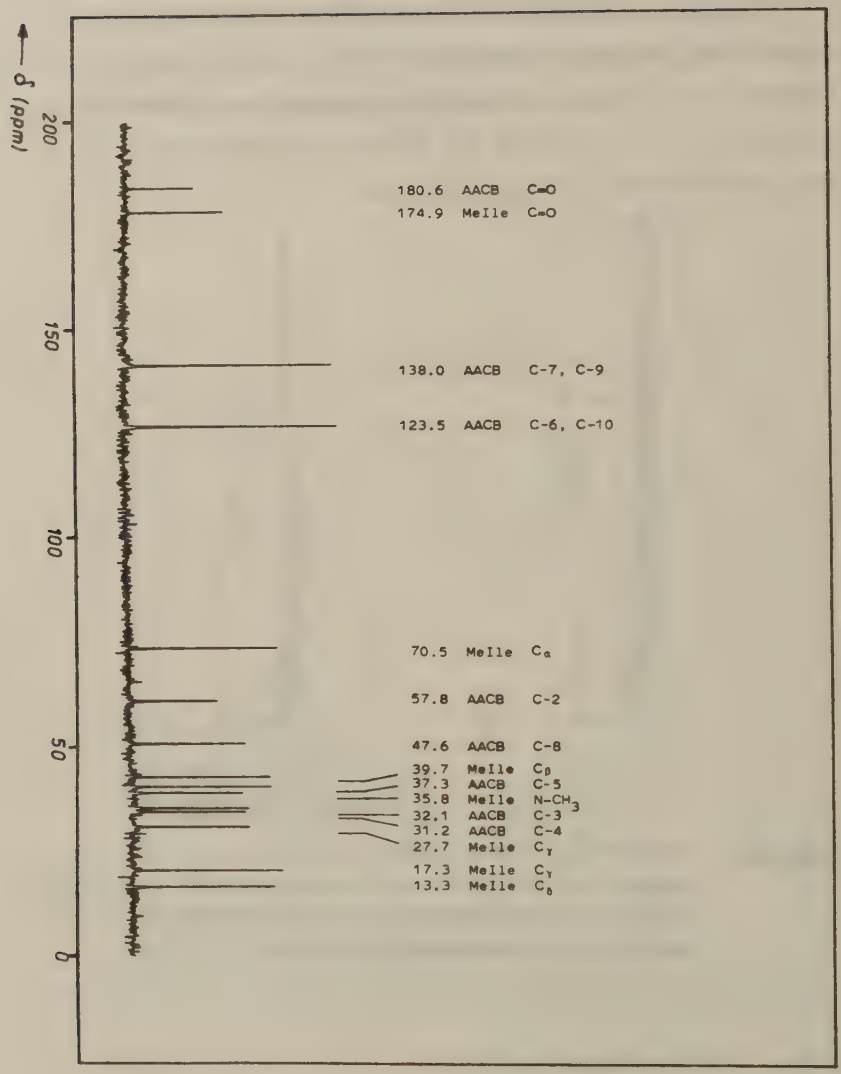


Abb. 19: ^{13}C-NMR-Spektrum von BC 1 (100.6 MHz; 25 °C; D_2O)

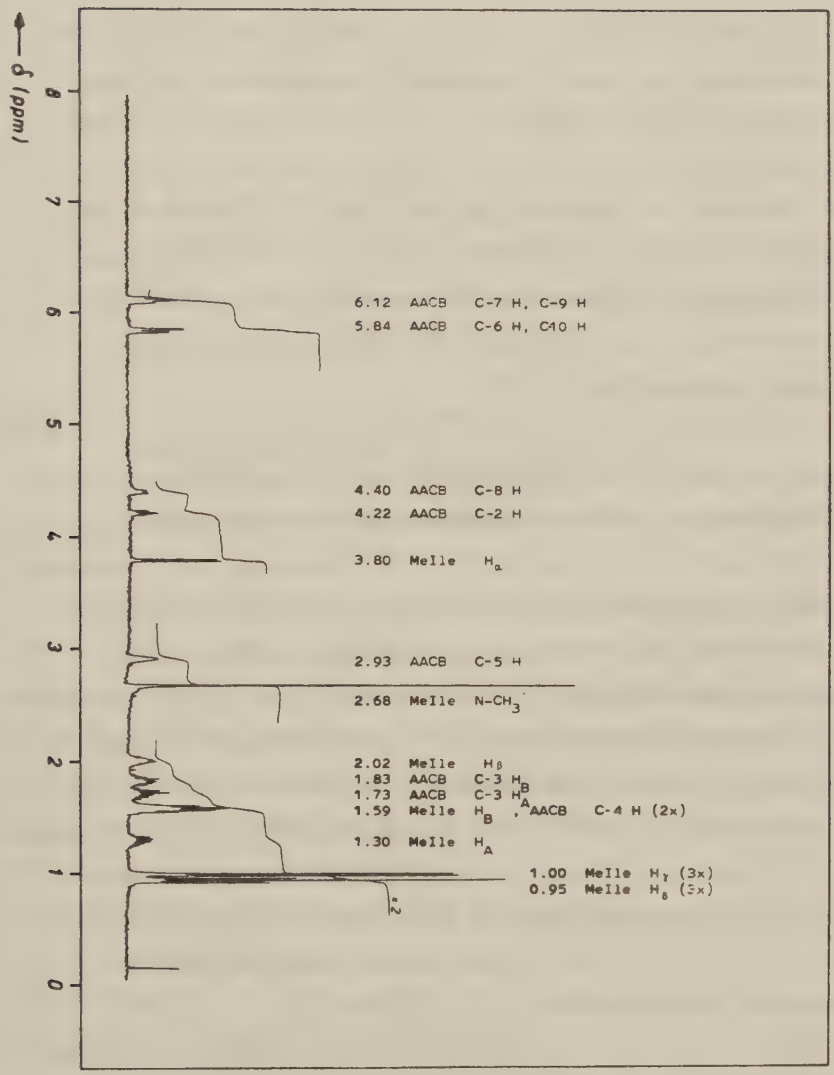


Abb. 20: ^{1}H-NMR-Spektrum von BC 1 (400.13 MHz; 25 °C; D_2O).

4.1.5. Sequenzanalyse von BC 1

Die klassische Sequenzierung durch Edman-Abbau (26) ist für Aminosäuren mit freier Aminogruppe beschrieben. Ist diese blockiert, wie in N-acetylierten oder cyclischen Peptiden, so läßt sich das Peptid nicht abbauen. Wie von BEYERMANN (27) am Beispiel des Sarkosins gezeigt, kann die Einwirkung von Phenylisothiocyanat auf N-Methylaminosäuren zu unerwünschten Nebenprodukten führen. Parallel zum klassischen Edman-Abbau wurde deshalb die Sequenzanalyse auch mit Methylisothiocyanat durchgeführt (28,29).

Die Identifizierung endständiger Aminosäuren läßt sich durch Überführung in ihre fluoreszierenden 5-Dimethylaminonaphthalin-1-sulfonyl-(Dansyl)-Derivate und anschließende zweidimensionale Dünnschichtchromatographie an Polyamid schnell und sicher durchführen (30,31,32). Die hohe Empfindlichkeit dieser Aminosäurenbestimmung, die noch 10 pmol einer Aminosäure nachweisen kann, wird bei der Dansyl-Edman-Sequenzierungsmethode ausgenützt. Dabei wird das Peptid stufenweise durch Carbamylierung mit Phenyl- bzw. Methylisocyanat und acidolytischer Cyclisierung zum Thiazolinon vom N-Terminus her abgebaut. Die jeweils neue N-terminale Aminosäure kann nach Umsetzung mit Dansylchlorid und anschließender Hydrolyse des Restpeptids bestimmt werden.
Zur zweifelsfreien Zuordnung der Dansylaminosäuren wurde auf der Rückseite der doppelseitig beschichteten Folien ein Testgemisch der zu erwartenden Dansylaminosäuren aufgetragen.

Abb. 21: Zweidimensionales Chromatogramm der Dansylderivate von Homophenylalanin und N-Methylisoleucin
Fließmittel: 1. Dimension: System V
2. Dimension: System VI; X = Start.

Da dansyliertes L-AACB als Vergleichssubstanz nicht zur Verfügung stand, wurden für die Sequenzanalysen die Antibiotika stets durch 90 minütige Hydrolyse bei 100 °C in die entsprechenden Homophenylalanin-Verbindungen überführt. Bei dieser Reaktion konnte keine Hydrolyse von Peptidbindungen beobachtet werden, so daß eine Verfälschung der Ergebnisse nicht zu befürchten war.
Die Abbaureaktionen mit Phenyl- und Methylisothiocyanat ergaben übereinstimmend Methylisoleucin als N-terminale Aminosäure von BC 1. Die Verknüpfung der Aminosäuren bei BC 1 lautete folglich: MeIle - AACB.

4.1.6. Massenspektren von BC 1

4.1.6.1. FD-Massenspektren

Durch Ionisierung der Probe aus adsorbiertem Zustand heraus erhält man Felddesorption-Massenspektren. Bei dieser Methode der Probenzufuhr wird die Substanz in einem geeigneten Lösungsmittel auf die Emitteroberfläche aufgebracht. Dadurch wird ein thermischer Zerfall der Moleküle, wie er bei der Verdampfungstechnik beobachtet wird, vermieden. Unter dem Einfluß eines extrem hohen elektrischen Feldes bilden sich positive Ionen. Neben dieser Art der Ionenbildung erzeugen auch feldinduzierte Reaktionen auf der Emitteroberfläche Ionen, so z.B. $(M+H)^+$ -, $(2M+H)^+$ - oder auch $(M+Na)^+$ -Ionen. Diese letzteren Ionenbildungsprozesse treten bei wenig flüchtigen Verbindungen gehäuft auf.
Die FD-Aufnahmetechnik zeigt aufgrund der schonenden Ionisierungsbedingungen eine deutlich erhöhte Intensität der Molekülionen und eine stark verminderte Fragmentierung. Sie eignet sich daher besonders für die Molmassenbestimmung empfindlicher hydrophiler Naturstoffe.

Das FD-Spektrum von BC 1 (Abb. 22) bestätigt die bisherigen Strukturvorstellungen. Neben einem intensiven $(M+1)^+$ -Ion mit m/e = 324 tritt ein Fragment-Ion mit m/e = 307 auf. Dieses Ion ist durch die Abspaltung von Ammoniak aus dem Molekülion zu erklären.

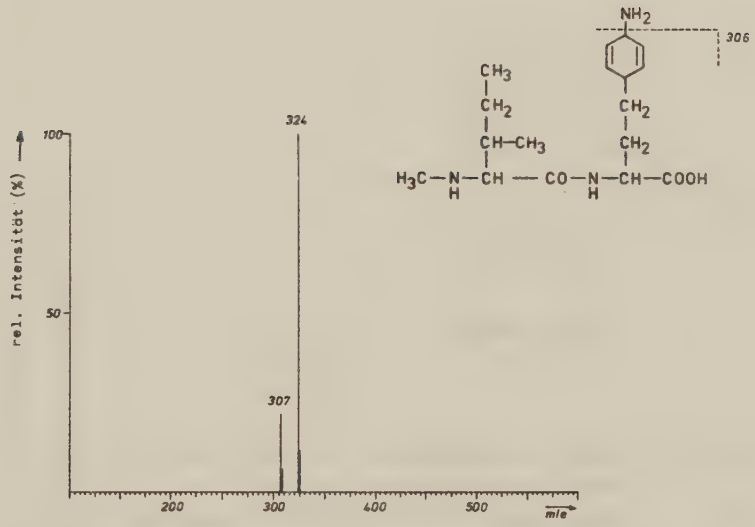


Abb. 22: FD-Massenspektrum von BC 1 (Molmasse ber. 323).

4.1.6.2. Gaschromatographisch-massenspektroskopische Untersuchungen

WEYGGAND (33) beschrieb die erste gaschromatographische Trennung von Peptiden, die als N-Trifluoracetyl (Tfa)-peptid-methylester ausreichend flüchtig waren.
Zur gaschromatographischen Untersuchung wurde BC 1 analog derivatisiert. Zuerst wurde mit Diazomethan verestert und anschließend mit Trifluoressigsäureanhydrid acyliert. Im Chromatogramm zeigten sich daraufhin zwei Hauptpeaks (Abb.23).

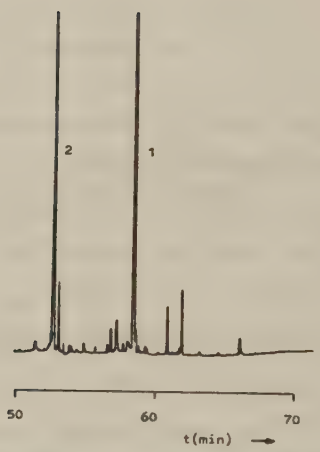


Abb. 23: Gaschromatogramm der N-Trifluoracetyl-peptid-methylester-Derivate von BC 1
Bedingungen: 25 m x 0.25 mm Quarzsäule SE 52;
Temperaturprogramm: 4 min 48 °C, dann 4 °C/min .

Von Peak 1 und 2 konnten Massenspektren aufgenommen werden:

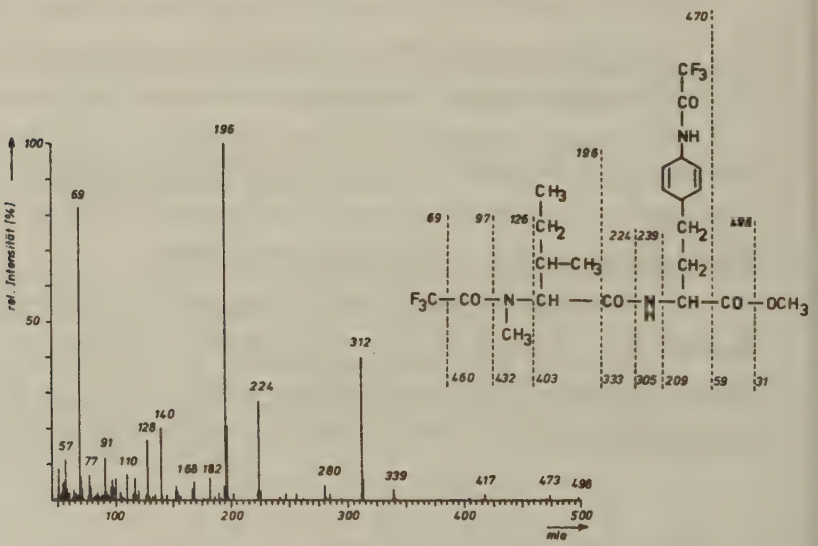


Abb. 24: Massenspektrum von Peak 1 der GC-MS-Untersuchung des trifluoracetylierten Dipeptid-methylesters von BC 1 (Molmasse ber. 529).

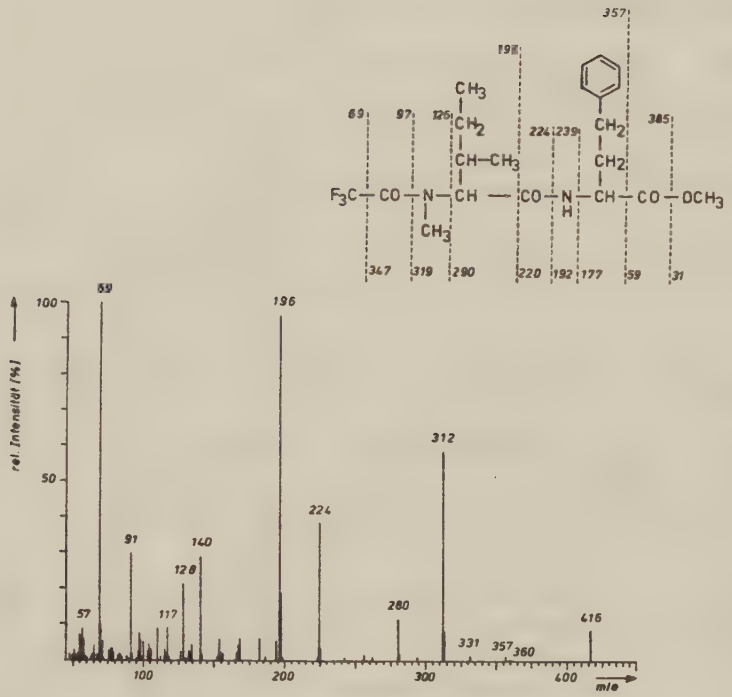


Abb. 25: Massenspektrum von Peak 2 der GC-MS-Untersuchung des trifluoracetylierten Dipeptid-methylesters (Molmasse ber. 416) aus BC 1

Peak 1 ließ sich als Derivat des intakten Moleküls interpretieren (Tab.10). Bei Peak 2 handelte es sich um das durch Eliminierung aus BC 1 entstandene Abbauprodukt Tfa-MeIle-HPhe-OMe.(Tab.11).

Tab. 10: Massenspektrum von N-Tfa-BC 1-OMe (Peak 1)

m/e	Masse des abgespaltenen Radikals	Struktur
498	31	OCH_3
473	56	Buten
470	59	$COOCH_3$
311	218	CF_3CO-NH-C_6H_6-CH_2-CH_2
224	196	CF_3CO-MeIle

Tab. 11: Massenspektrum von Tfa-MeIle-HPhe-OMe (Peak 2)

m/e	Masse des abgespaltenen Radikals	Struktur
416		M^+
360	56	Buten
357	59	$COOCH_3$
311	105	C_6H_5-CH_2-CH_2
224	192	CF_3CO-MeIle

Diese Ergebnisse wurden auch durch GC-MS-Untersuchungen mit N-Pentafluoropropionyl-peptid-n-propylester von hydrolysiertem BC 1 bestätigt. Nicht vollständig hydrolysierte Proben zeigten stets das zu Peak 2 analoge N-Pentafluoropropionyl-peptid-n-propylester-Derivat (Abb.26).

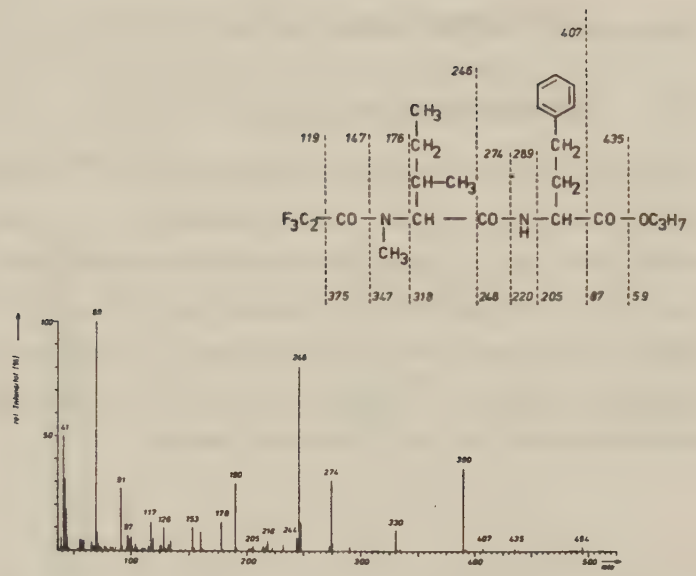
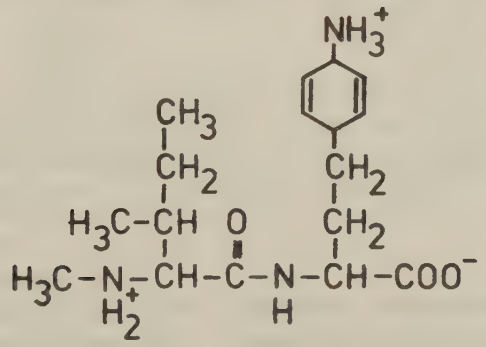


Abb. 26: Massenspektrum von N-Pentafluoropropionyl-N-methyl-isoleucyl-homophenylalanin-n-propylester (Molmasse ber. 494)

Die vollständige Bezeichnung der Struktur des isolierten Antimetaboliten BC 1 lautet somit:



L-N-Methylisoleucyl-L-2-amino-4-(4'-amino-2',5'-cyclohexadienyl)-butansäure.

4.2. Strukturermittlung von BC 4

4.2.1. Aminosäurenanalyse

Die größte strukturelle Übereinstimmung mit BC 1 zeigte das Antibiotikum BC 4. In der Aminosäurenanalyse des Totalhydrolysats von BC 4 fanden sich als ninhydrinpositive Bestandteile Ammoniak, Homophenylalanin und zusätzlich Glutaminsäure. Durch Überführung des Hydrolysats in N-Pentafluoropropionyl-aminosäure-n-propylester konnte L-Glutaminsäure als Bestandteil von BC 4 bestätigt werden.

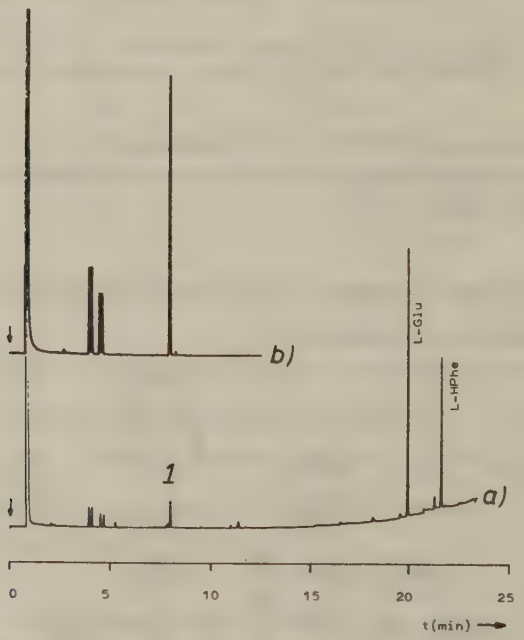


Abb. 27: Gaschromatographische Trennung der N-Pentafluoropropionyl-aminosäure-n-propylester des Totalhydrolysats (a) von BC 4 und (b) von N-Methylisoleucin an Chirasil-Val. (Die beiden Doppelpeaks, hier bei RT 4-5 min, tauchten stets im Gaschromatogramm von Pfp-Derivaten der N-Methylaminosäurepropylester auf)

Ein Vergleich der GC-MS-Spektren belegte, daß es sich bei Peak 1 wie bei BC 1 um N-Methylisoleucin handelte. Wie bei BC 1 so lag auch bei BC 4 das N-Methylisoleucin in der L-Konfiguration vor.

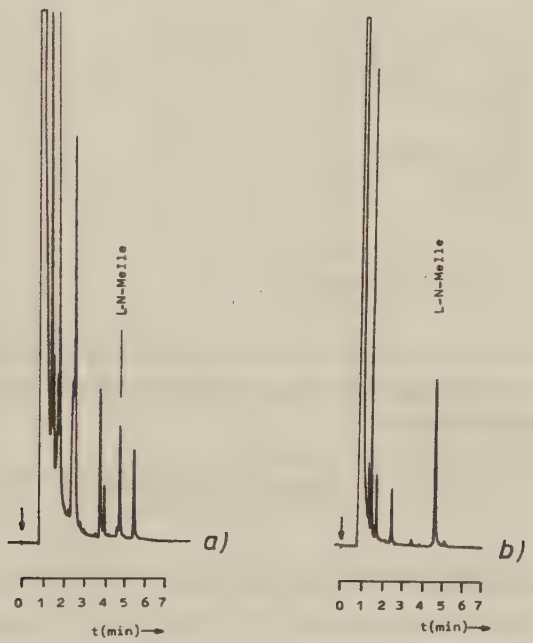


Abb. 28: Auftrennung von D,L-N-Methylisoleucin als N-tert.Butyl-ureido-N-tert.butylamid-Derivat (a) aus dem Totalhydrolysat des Tripeptids BC 4 und (b) von reinem L-N-Methylisoleucin.

Zur Bestimmung der Tripeptid-Sequenz wurde ein Dansyl-Edman-Abbau durchgeführt. BC 4 wurde zu diesem Zweck in das entsprechende Homophenylalanyl-Peptid überführt. Der Edman-Abbau ergab die Sequenz: MeIle-HPhe-Glu.

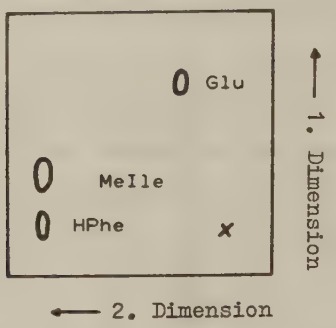


Abb. 29: Zweidimensionales Chromatogramm der Dansylderivate von Homophenylalanin, N-Methylisoleucin und Glutaminsäure
Fließmittel: 1. Dimension: System V
2. Dimension: System VI; X = Start

Da unter diesen Bedingungen die Hydrolyse einer möglicherweise vorhandenen Säureamidgruppe aus Gln oder Glu-NH_2 nicht zu erwarten war, konnte dieses Ergebnis als Beweis für Glu als C-terminale Aminosäure gelten. Gegen das Vorliegen eines Amids sprachen auch die quantitativen Untersuchungen des Ammoniakgehalts. Sorgfältige Vergleichsanalysen ergaben, daß die Hauptmenge des gebildeten Ammoniaks bei der Hydrolyse von AACB zu HPhe (siehe S.30) entstand. Die Hydrolyse eines Carbonsäureamids konnte damit ausgeschlossen werden.

4.2.2. FD-Massenspektrum von BC 4

Das FD-Spektrum bestätigte die Tripeptidstruktur von BC 4.

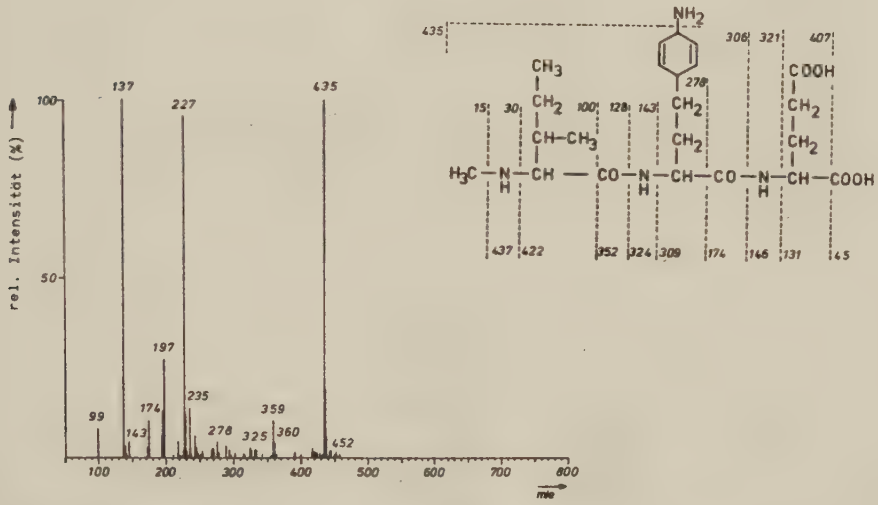


Abb. 30: FD-Massenspektrum von nicht derivatisiertem BC 4 (Molmasse ber. 452)

Einige Peak-Zuordnungen sind in Tabelle 12 aufgeführt:

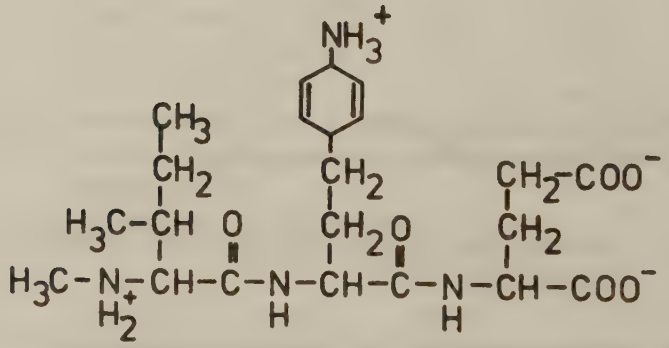
Tab. 12: FD-Massenspektrum von BC 4

m/e	Masse des abgespaltenen Radikals	Struktur
453		$(M+1)^+$
452		M^+
450	2	H_2
435	17	NH_3
390	45	COOH
360	75	COOH, $NH-CH_3$

Das Trifluoracetyl-BC 4-OMe-Derivat konnte gaschromatographisch nicht untersucht werden, es erwies sich als zu wenig flüchtig.

4.2.3. NMR-Spektren von BC 4

Die NMR-Spektren von BC 4 (Abb.31 und 32) konnten vollständig interpretiert werden und bestätigten die Struktur von BC 4.



L-N-Methylisoleucyl-L-2-amino-4-(4'-amino-2',5'-cyclohexadienyl)-butanoyl-L-glutaminsäure

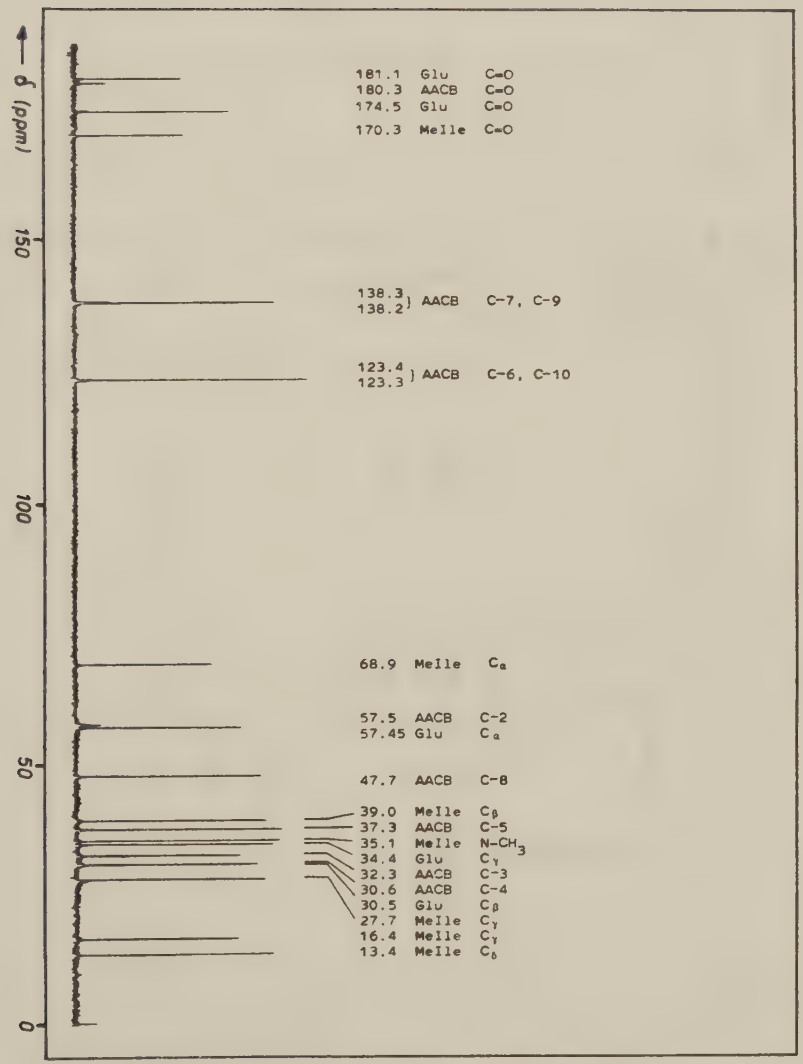


Abb. 31: ^{13}C-NMR-Spektrum von BC 4 (100.6 MHz; 25 °C; D_2O)

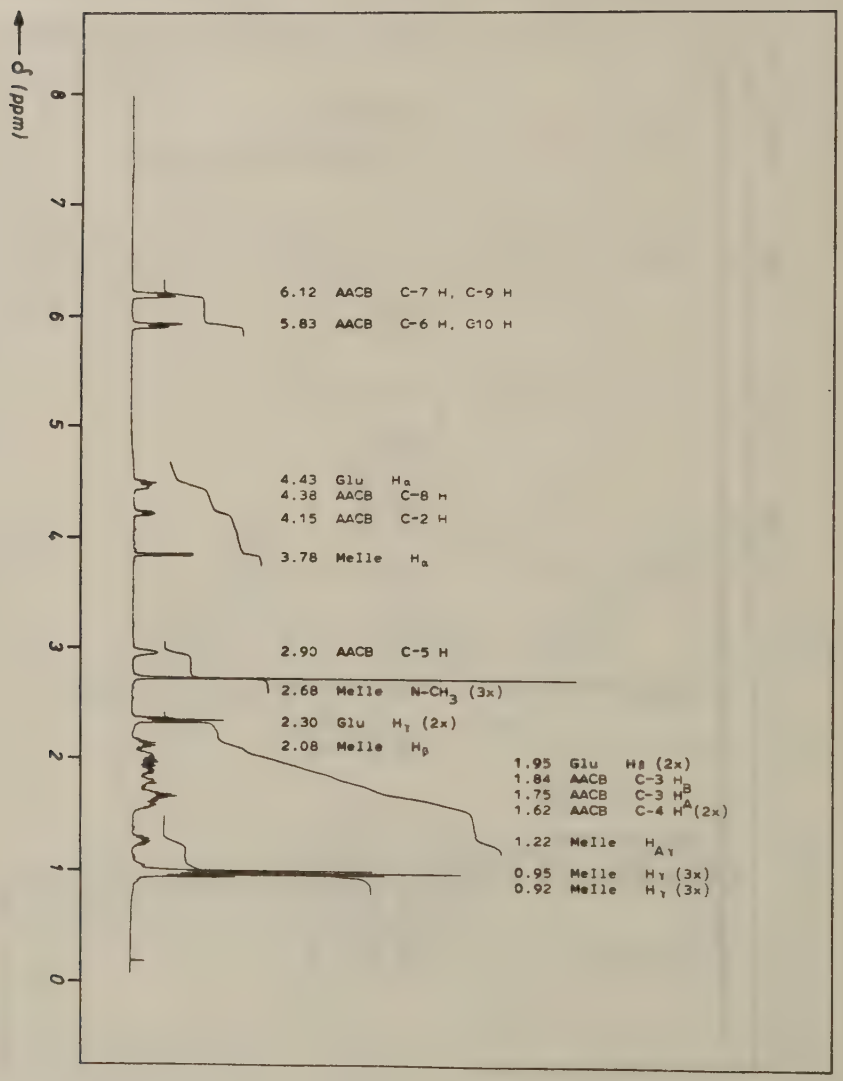


Abb. 32: ^{1}H-NMR-Spektrum von BC 4 (400,13 MHz; 25 °C, D_2O)

4.3. Strukturermittlung von BC 3

4.3.1. Gaschromatographisch-massenspektroskopische Untersuchungen

Im Totalhydrolysat dieses Antibiotikums fand sich neben Homophenylalanin keine weitere ninhydrinpositive Aminosäure. Als Pentafluoropropionyl-aminosäure-n-propyl-Derivat zeigte sich dagegen ein weiterer Bestandteil, der durch GC-MS-Untersuchungen (Abb. 33 und 34) unter Einbeziehung von NMR-Daten als N-Methylvalin gedeutet werden konnte.

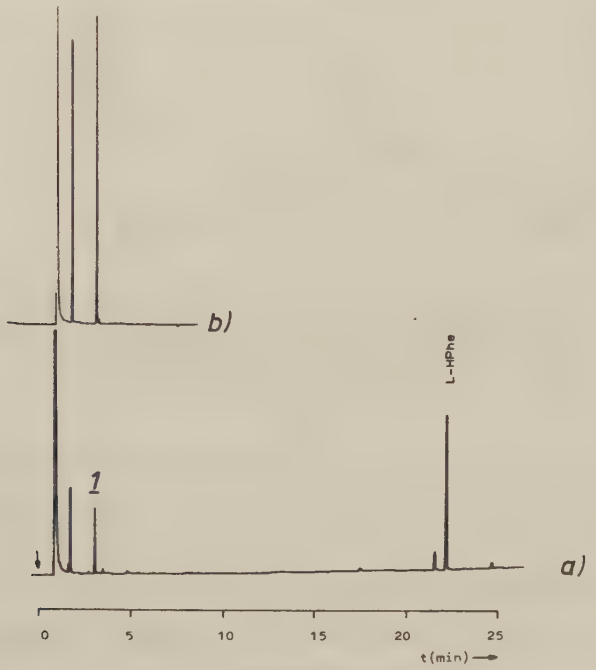


Abb. 33: Gaschromatographische Trennung der N-Pentafluoropropionyl-aminosäuren-n-propylester (a) des Totalhydrolysats von BC 3 und (b) von N-Methylvalin an Chirasil Val

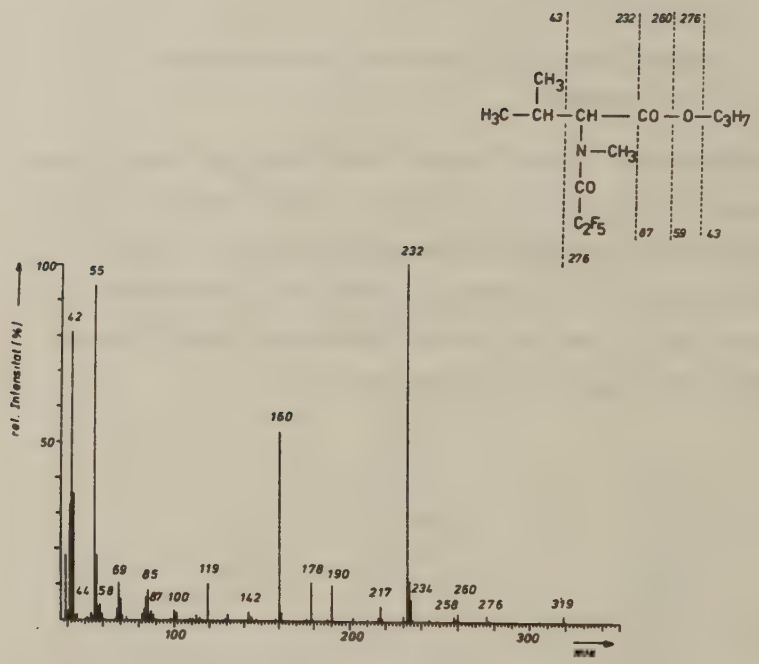


Abb. 34: Massenspektrum von N-Pentafluoropropionyl-N-methylvalin-n-propylester, Molmasse ber. 319, (Peak 1 im GC-MS-Chromatogramm Abb.33)

Die Konfiguration dieser N-methylierten Aminosäure ergab sich aus dem Vergleich mit D,L-N-Methylvalin als L-Konfiguration. Dabei war zu beachten, daß im Gegensatz zu N-Pentafluoropropionyl-aminosäuren-n-propylester-Derivaten das D-Enantiomere von D,L-N-Isopropyl-ureido-aminosäuren-N-isopropylamid-Derivaten der D,L-N-Methylaminosäuren nach dem L-Enantiomeren eluiert wurde (Abb.35).

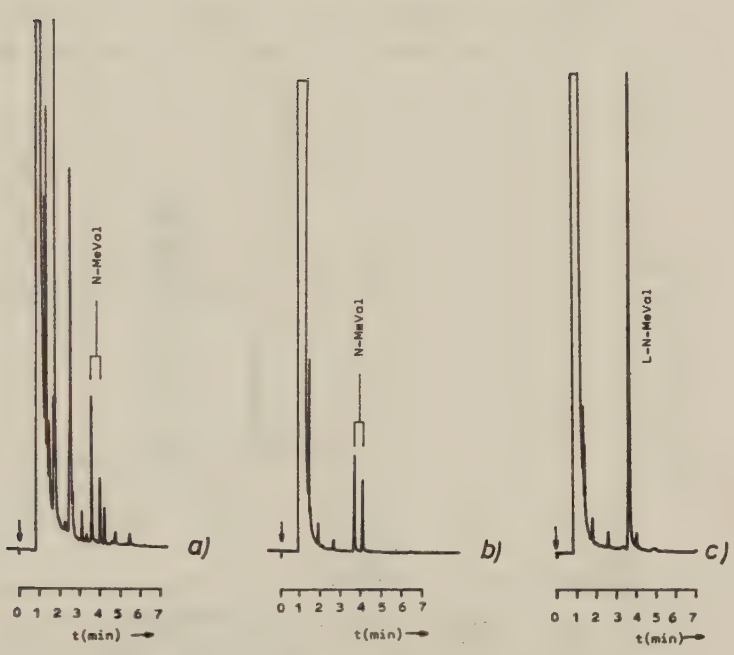


Abb. 35: Auftrennung von D,L-N-Methylvalin als N-tert. Butylureido-N-tert. butylamid-Derivat aus (a) Totalhydrolysat von BC 3 sowie (b) von D,L-N-Methylvalin und (c) von L-N-Methylvalin.

Das FD-Massenspektrum von BC 3 zeigte mit den Massen 310 und 309 die Peaks der Molekülionen $(M+1)^+$ und M^+. Des weiteren war die typische Abspaltung von Ammoniak zu beobachten, durch die Ionen mit um 17 Einheiten geringeren Massen erhalten wurden (Abb.36).

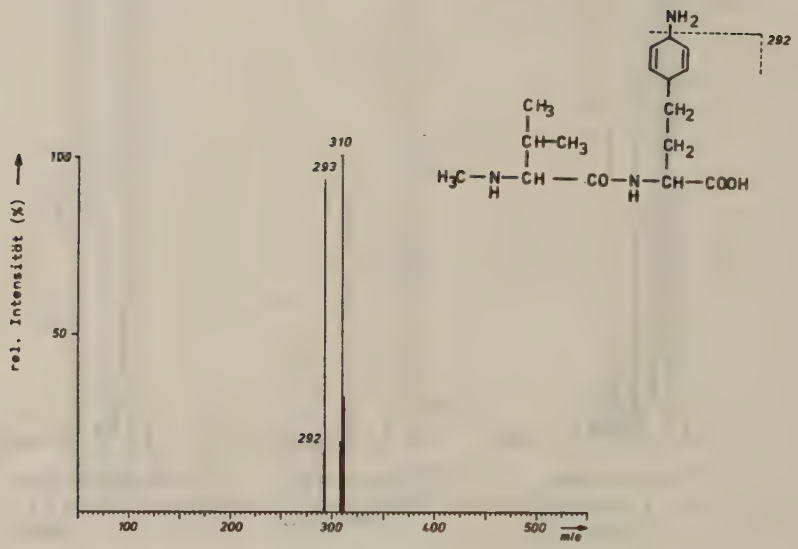


Abb. 36: FD-Massenspektrum von BC 3 (Molmasse ber. 309)

Der Antimetabolit BC 3 wurde mit Diazomethan und Trifluoressigsäureanhydrid zum Tfa/OMe-Derivat umgesetzt. Im Gaschromatogramm zeigten sich daraufhin 4 Peaks (Abb.37).

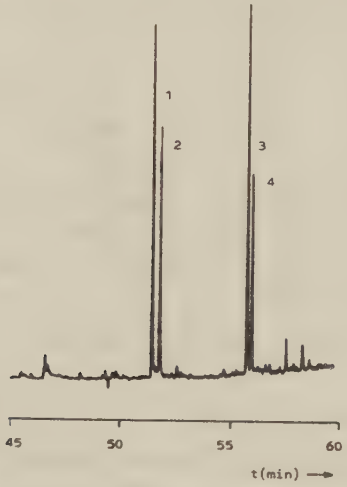


Abb. 37: Gaschromatogramm der trifluoracetylierten Methylester-Derivate von BC 3.
Bedingungen: 25 m x 0,25 mm Quarzsäule SE 52
Temperaturprogramm: 120 °C, dann 3 °C/min bis 310°C.

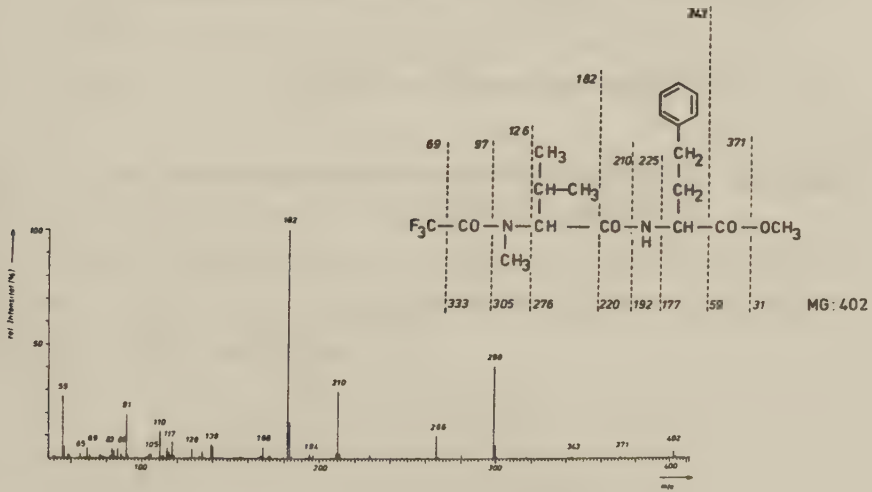


Abb. 38: Massenspektrum von derivatisiertem BC 3:
GC-MS-Peak 1 in Abb. 37

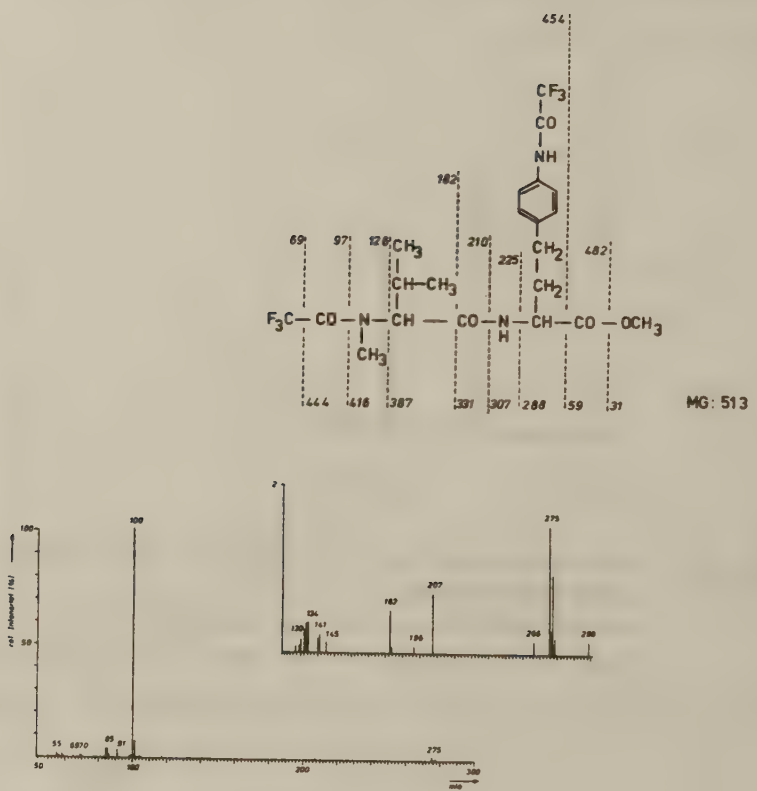


Abb. 39: Massenspektrum von derivatisiertem BC 3: GC-MS-Peak 2 in Abb. 37 .

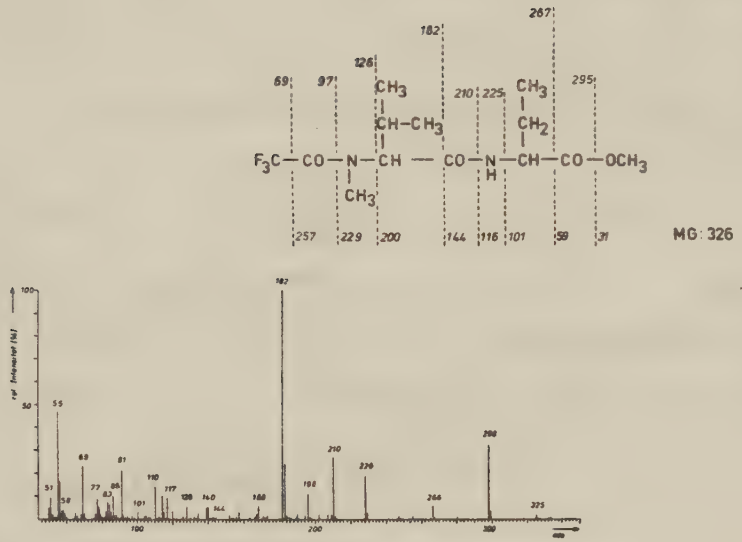
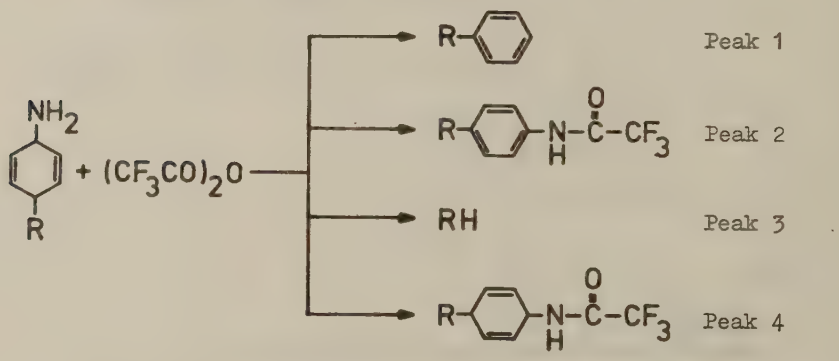


Abb. 40: Massenspektrum von derivatisiertem BC 3: GC-MS-Peak 3 in Abb. 37.

In allen Massenspektren der Peaks 1 bis 3 taucht das charakteristische Fragment-Ion bei m/e von 298 auf. Dieses Ion entsteht bei Spaltung der Bindung zwischen α- und ß-C-Atom des Grundkörpers AACB (bzw. von HPhe)(Abb.38 bis 40).

Eine eindeutige Entscheidung, ob N-Tfa-BC 3-OMe oder das entsprechende HPhe-Derivat dem Peak 3 oder 4 zuzuordnen war, konnte nicht getroffen werden. Von Peak 4 wurden im Massenspektrum nur niedermolekulare Ionen erhalten, die eine Interpretation nicht erlaubten.

Die Interpretation der Massenspektren dieser Derivate führte zu der Annahme, daß das substituierte Cyclohexadienyl-System des Antibiotikums alle Eliminierungsmöglichkeiten nutzt, die zur Bildung eines stabilen aromatischen Systems führen:



Bei analogen Untersuchungen an BC 1 waren nur die zwei Hauptprodukte - entsprechend Peak 1 und 2 - aufgefallen. Daneben entstanden aber noch weitere Derivate, von denen aufgrund der geringen Mengen keine Massenspektren aufgenommen werden konnten. Das stabilste Derivat des Antibiotikums BC 3 ist, wie auch bei BC 1, das Homophenylalanin enthaltende Dipeptid. Man findet es auch in unvollständig hydrolysierten Proben von BC 3.

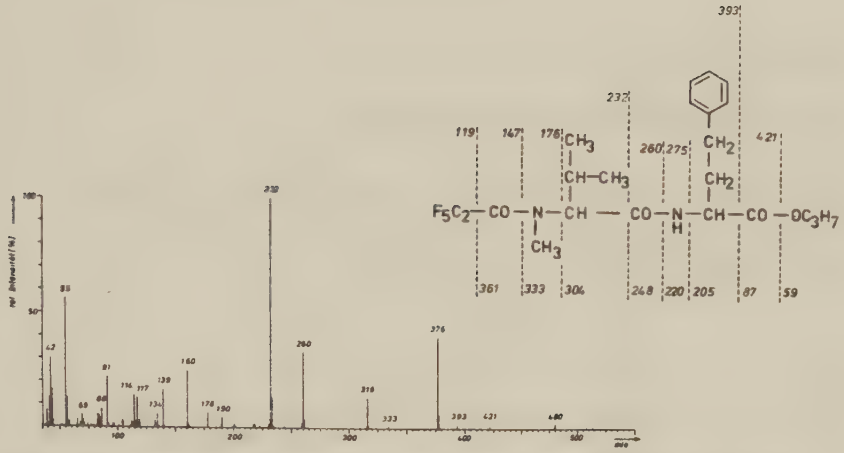


Abb. 41: Massenspektrum von Pfp-MeVal-HPhe-OnPr (Molmasse ber. 480) aus unvollständig hydrolysierter Probe von BC 3 (24 h/6 N HCl / 110 °C)

4.3.2. Sequenzierung von BC 3

Der Wirkstoff BC 3 wurde in das entsprechende Homophenylalanin-Derivat überführt und nach EDMAN abgebaut. Als C-terminale Aminosäure fand sich N-Methylvalin. Die Verbindung BC 3 ist somit das N-Methylvalin enthaltende Analoge zu BC 1: MeVal-AACB.

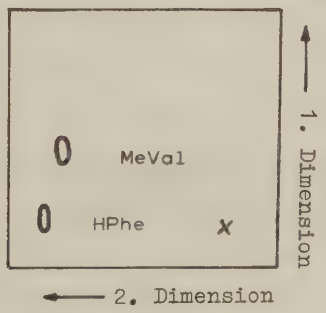


Abb. 42: Zweidimensionales Chromatogramm der Dansylderivate von Homophenylalanin und N-Methylvalin
Fließmittel: 1. Dimension: System V
2. Dimension: System VI; X = Start

4.3.3. NMR-Spektren

4.3.3.1. NMR-Spektren von N-Methylvalin

Die NMR-Spektren von N-Methylvalin (Abb.43 und 44) zeigten erwartungsgemäß chemische Verschiebungen, wie sie auch in den Aufnahmen von BC 3 zu finden sind.

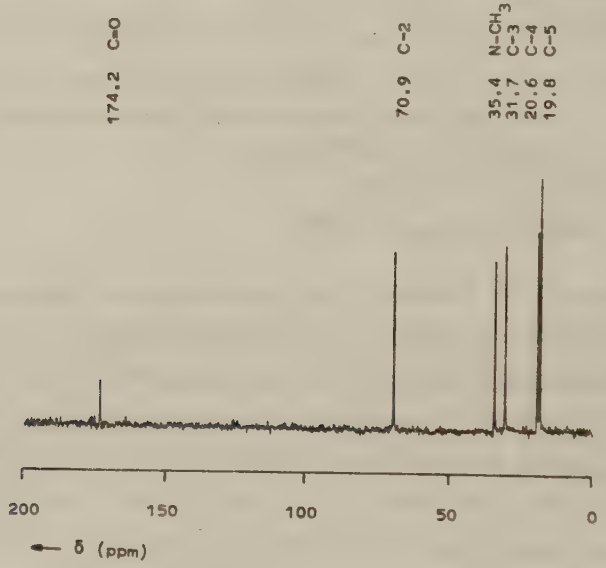


Abb. 43: ^{13}C-NMR-Spektrum von N-Methylvalin (D_2O, pH=1; 20,115 MHz; 25 °C)

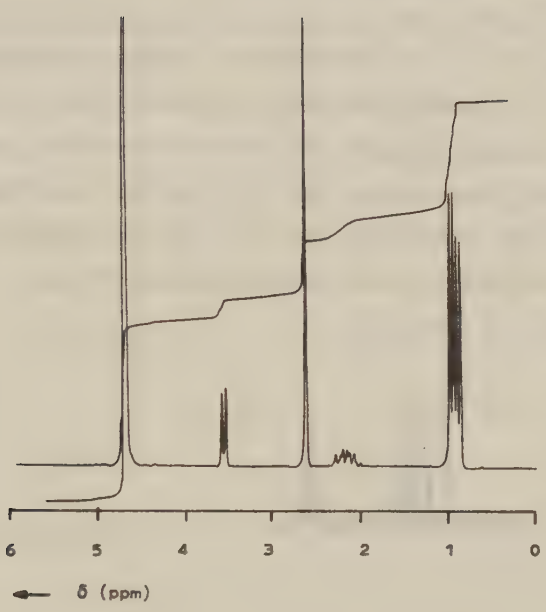


Abb. 44: ^{1}H-NMR-Spektrum von N-Methylvalin (D_2O, pH = 1; 90 MHz).

4.3.3.2. NMR-Spektren von BC 3

Bei der Zuordnung von Signalen, die sich in ihrer Multiplizität unterscheiden, zeigte das Spin-Echo-Experiment deutliche Vorteile gegenüber der üblichen Off-Resonance-Methode. So bestand z. B. bei BC 3 das Problem der Zuordnung des C_β-Atoms von N-Methylvalin.

Aufgrund der chemischen Verschiebung kamen dafür nur die beiden ^{13}C-Signale bei 32.1 ppm und 32.4 ppm in Frage. In Abb. 45 sind die beiden Meßmethoden einander gegenübergestellt. Im Gegensatz zum wenig übersichtlichen Off-Resonance-Spektrum ordnete das Spin-Echo-Spektrum eindeutig die chemische Verschiebung von 32.4 ppm dem gesuchten Methinkohlenstoff zu. Das Signal bei 32.1 ppm war aufgrund der negativen Amplitude einem Methylenkohlenstoffsignal zuzuordnen:

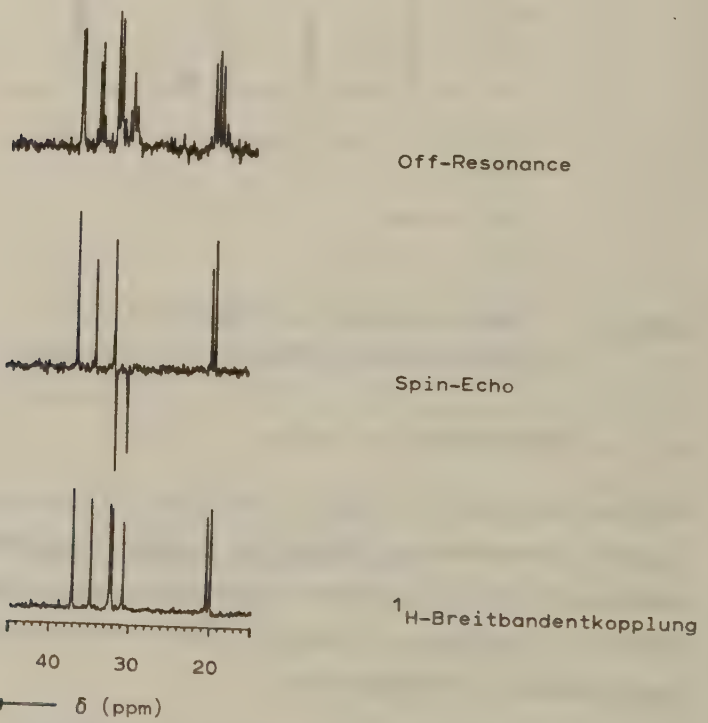


Abb. 45: Ausschnitte der ^{13}C-NMR-Spektren von BC 3 (D_2O, pH = 7; 100,6 MHz; 25 °C).

Eine vollständige Zuordnung der NMR-Signale zeigen Abb.46 und 47.

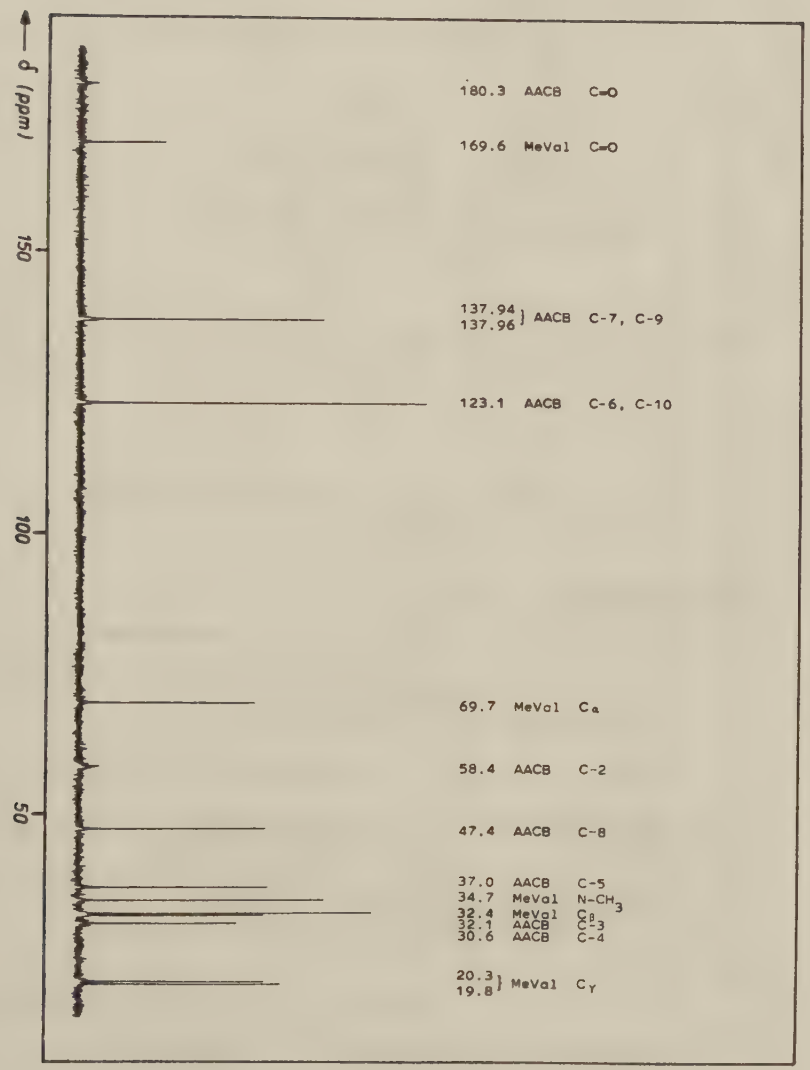


Abb. 46: ^{13}C-NMR-Spektrum von BC 3 (100,6 MHz; 25 °C; D_2O, pH=7).

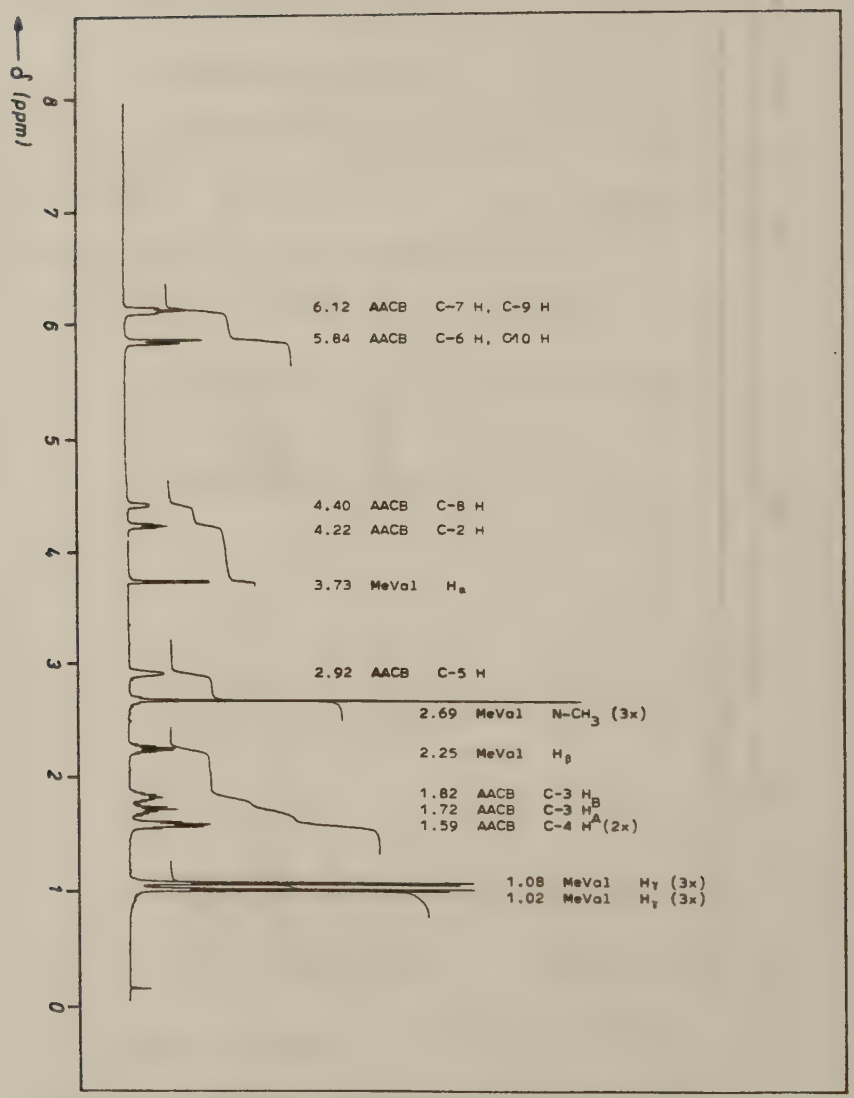
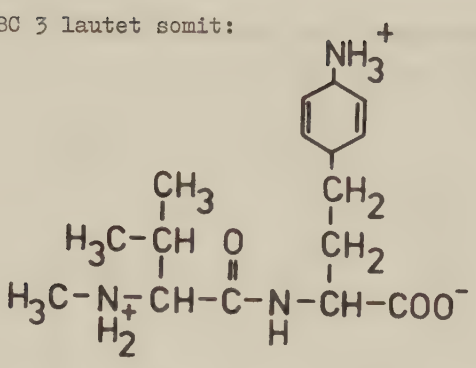


Abb. 47: ^{1}H-NMR-Spektrum von BC 3 (400,13 MHz;25°C;D_2O,pH=7).

Die Struktur von BC 3 lautet somit:



L-N-Methylvalyl-L-2-amino-4-(4'-amino-2',5'-cyclohexadienyl)-butansäure.

5. STRUKTURAUFKLÄRUNG DER ANTIBIOTIKA BC 2, 5 UND 6

Zu dieser Gruppe wurden isolierte Antibiotika zusammengefaßt, die neben dem abgeleiteten Grundkörper L-AACB ausschließlich proteinogene Aminosäuren enthielten.

5.1. Aminosäurenanalyse

So fand sich im Totalhydrolysat des Antimetaboliten BC 2 neben Homophenylalanin die Aminosäure Isoleucin, im Hydrolysat von BC 5 trat zusätzlich noch Glutaminsäure auf. Die Spaltprodukte im Hydrolysat von BC 6 erwiesen sich als die Aminosäuren Homophenylalanin, Glutaminsäure und Valin:

Antibiotikum	Aminosäuren im Hydrolysat
BC 2	HPhe, Ile
BC 5	HPhe, Ile, Glu
BC 6	HPhe, Val, Glu

Die Überprüfung der Konfiguration ergab für alle Aminosäuren die L-Konfiguration (Abb.48).

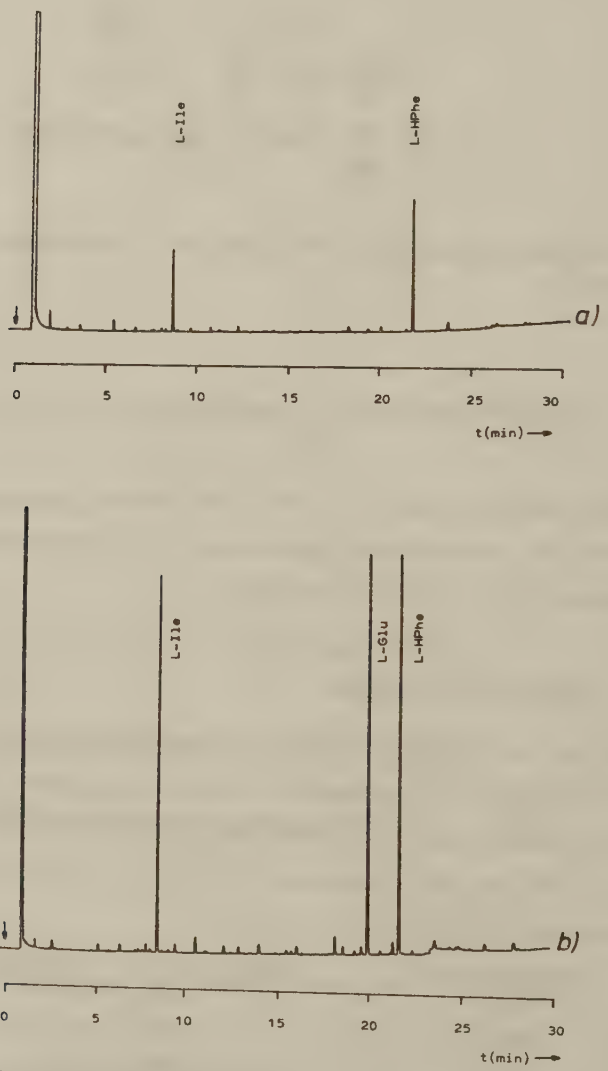


Abb. 48: Legende siehe S. 83.

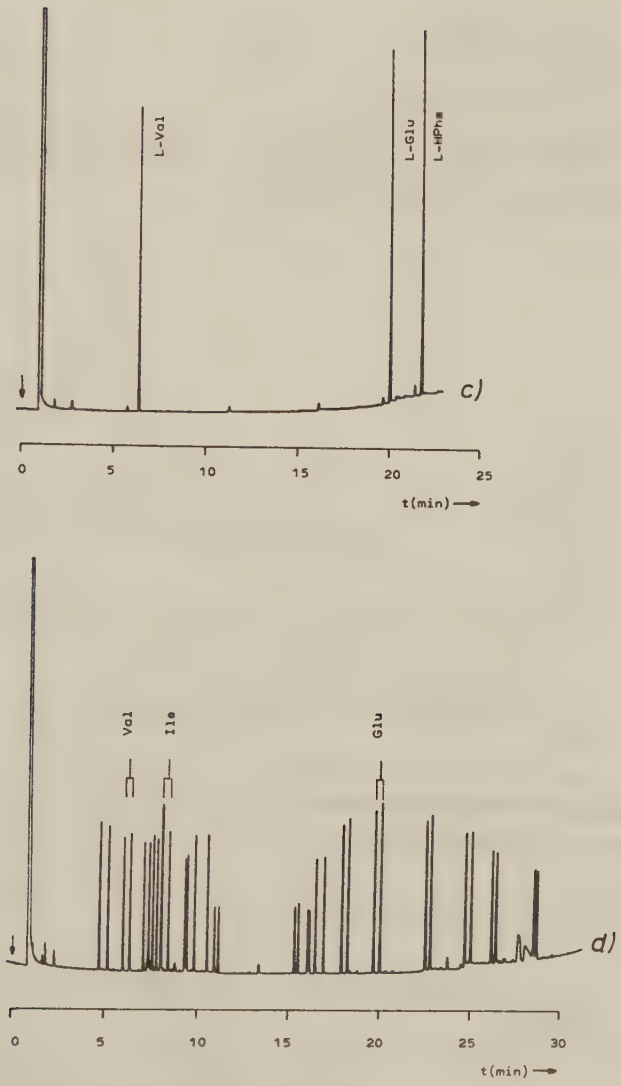


Abb. 48: Gaschromatographische Trennung der N-Pentafluoro-propionyl-aminosäuren-n-propylester des Totalhydrolysats (a) von BC 2, (b) von BC 5 und (c) BC 6, sowie (d) ein Testchromatogramm.

5.2. Massenspektren

5.2.1. FD-Massenspektren

Die FD-Massenspektren bestätigten die vermutete Dipeptid-Struktur von BC 2 (Abb.49, Tab.13).

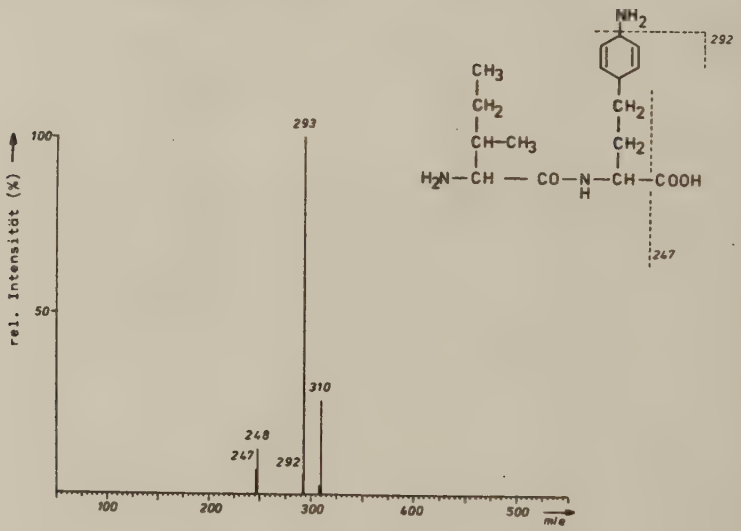


Abb. 49: FD-Massenspektrum von nicht derivatisiertem BC 2 (Molmasse ber. 309)

Tab. 13: FD-Massenspektrum von BC 2

m/e	Masse des abgespaltenen Radikals	Struktur
310		$(M+1)^+$
309		M^+
293	17	NH_3
292	17	NH_3
248	62	NH_3, COOH
247	62	NH_3, COOH

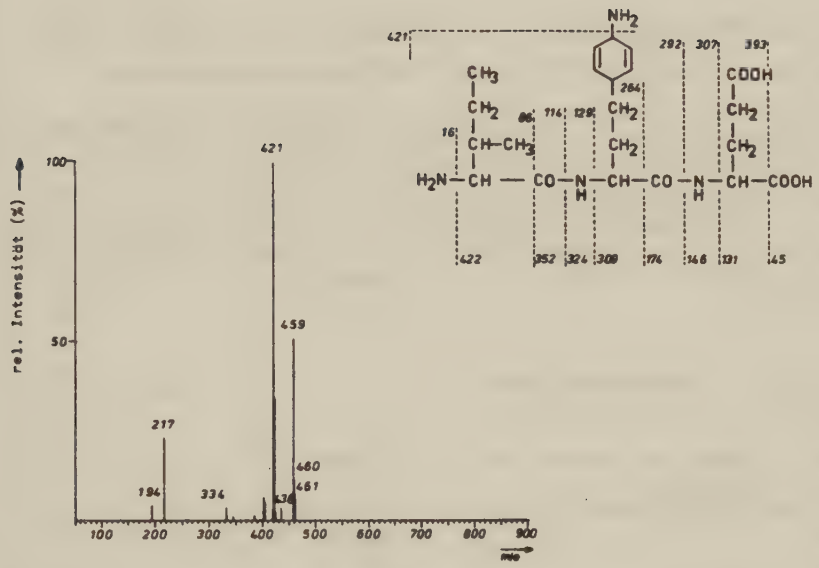


Abb. 50: FD-Massenspektrum von BC 5 (Molmasse ber. 438).

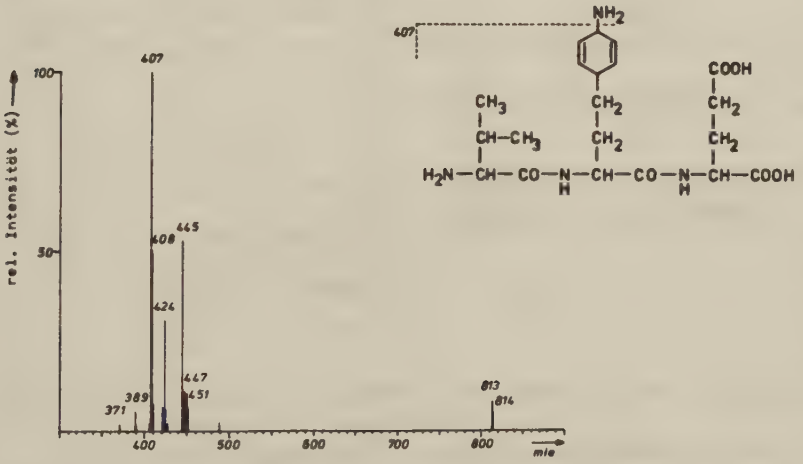


Abb. 51: FD-Massenspektrum von BC 6 (Molmasse ber. 424).

In den FD-Massenspektren der Antibiotika BC 5 (Abb.50,Tab.14) und BC 6 (Abb.51,Tab.15) findet man neben den erwarteten M^+-Peaks dieser Verbindungen auch Ionenpeaks höherer Massen. Diese bilden sich üblicherweise bei polaren Molekülen durch feldinduzierte Reaktionen auf der Emitteroberfläche. So finden sich in den Spektren zusätzlich Ionen wie $(M+Na)^+$ und $(2M+H)^+$.

Tab. 14: FD-Massenspektrum von BC 5

m/e	Masse des abgespaltenen Radikals	Struktur
461		$(M+Na)^+$
438		M^+
421	17	NH_3
347	91	NH_3 (2x), Buten
335	103	NH_3, $CH(NH_2)-CH(CH_3)-CH_2-CH_3$

Tab. 15: FD-Massenspektrum von BC 6

m/e	Masse des abgespaltenen Radikals	Struktur
814		$(2(M-17)+1)^+$
451		$(M^-+(Na^+)_2 - NH_3)$
447		$(M+Na)^+$
424		M^+
408	17	NH_3
407	17	NH_3

5.2.2. Gaschromatographisch-massenspektroskopische Untersuchungen

Bei dem trifluoracetylierten Methylester von BC 2 bestätigte sich das schon bei BC 3 gefundene Reaktionsverhalten. Die gaschromatographische Analyse ergab übereinstimmend neben N-Tfa-BC 2 -OMe drei Abbauprodukte des L-AACB-Grundkörpers.

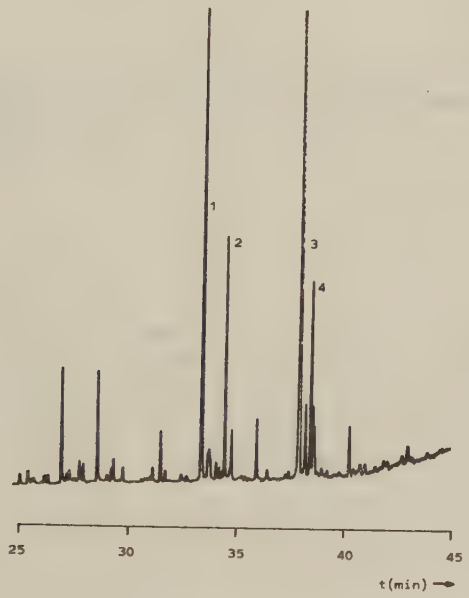
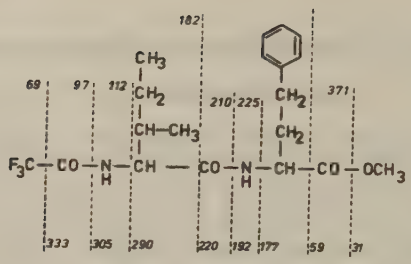
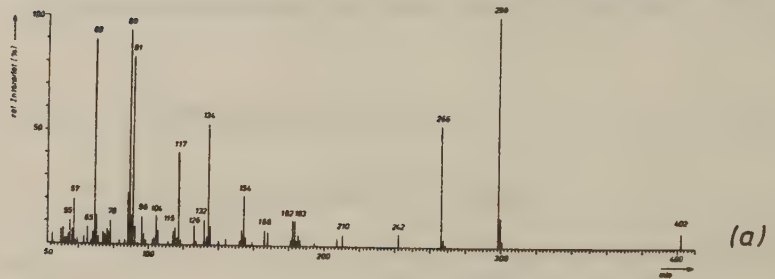
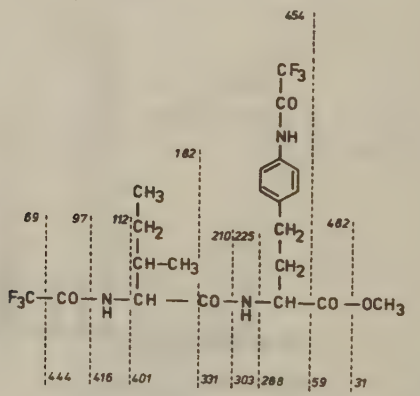


Abb. 52: Gaschromatogramm der trifluoracetylierten Methylester-Derivate von BC 2.
Bedingungen: 25 m x 0,25 mm Quarzsäule SE 52
Temperaturprogramm: 60°C, dann 3°C/min bis 310°C.







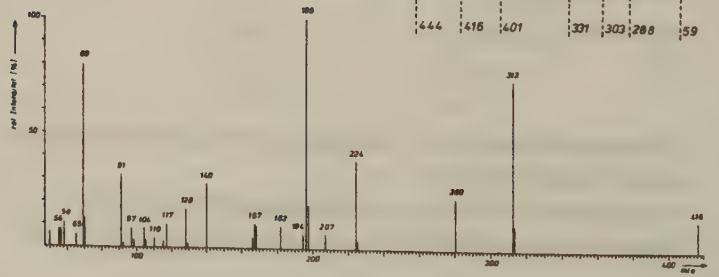


Abb. 54: Massenspektren von derivatisiertem BC 2:
(a)von GC-MS-Peak 1 und (b)von GC-MS-Peak 2, Abb.52.

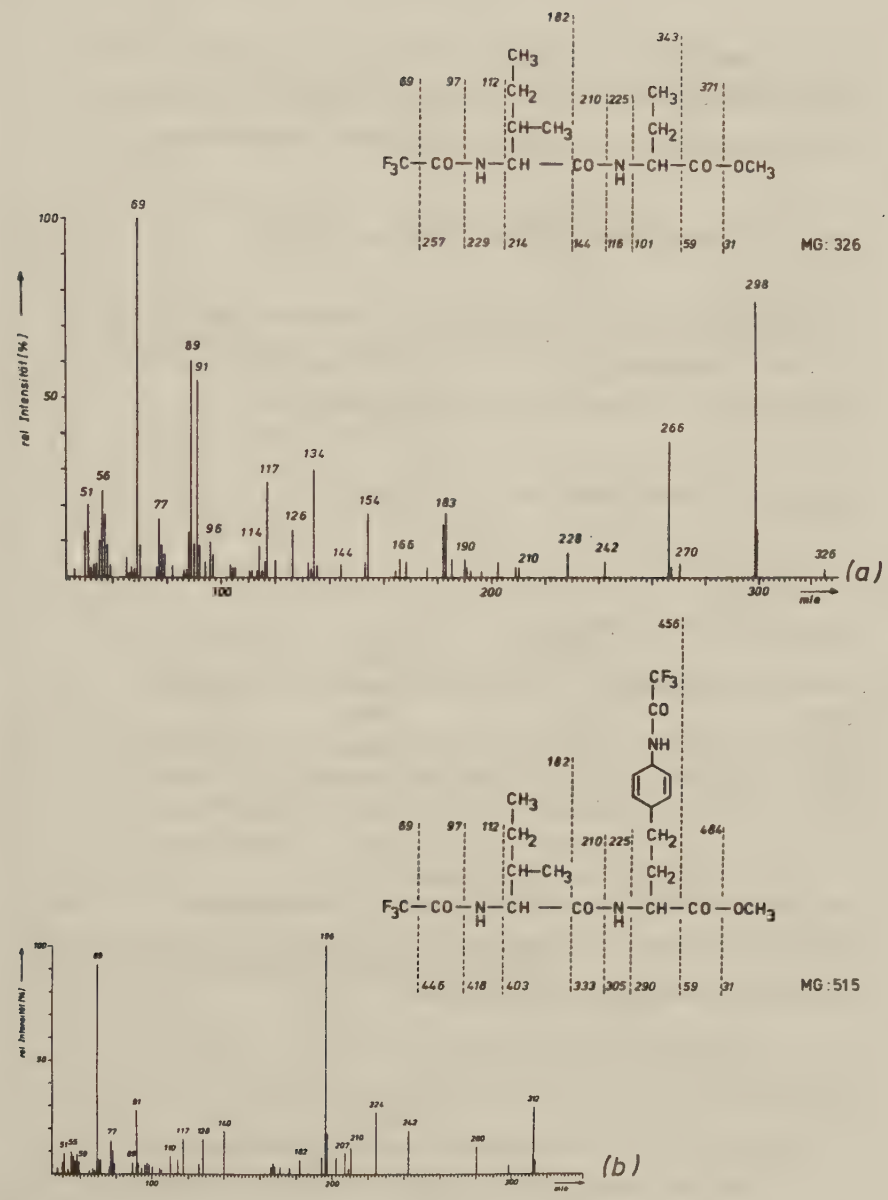


Abb. 55: Massenspektren von derivatisiertem BC 2:
(a)von GC-MS-Peak 3 und (b)von GC-MS-Peak 4,Abb.52.

Zu BC 2 analog derivatisierte Proben von BC 5 und 6 konnten gaschromatographisch nicht analysiert werden. Die mangelnde Flüchtigkeit der Derivate erlaubte keine Untersuchung.

5.3. Dansyl-Edman-Abbau von BC 2, 5 und 6

In Tabelle 16 sind die Resultate der Sequenzierung von BC 2, BC 5 und 6 dargestellt. Auch diese Antibiotika wurden zuerst hydrolytisch in Homophenyl-Derivate überführt.

Tab. 16: Edman-Abbau von BC 2, 5 und 6

Antibiotikum	Abbaustufe 1	2	3
BC 2	Ile	HPhe	
BC 5	Ile	HPhe	Glu
BC 6	Val	HPhe	Glu

Der Edman-Abbau ergab bei BC 5 und 6 Glutaminsäure als C-terminale Aminosäure. Glutamin konnte wie bei BC 4 eindeutig als Bestandteil ausgeschlossen werden.

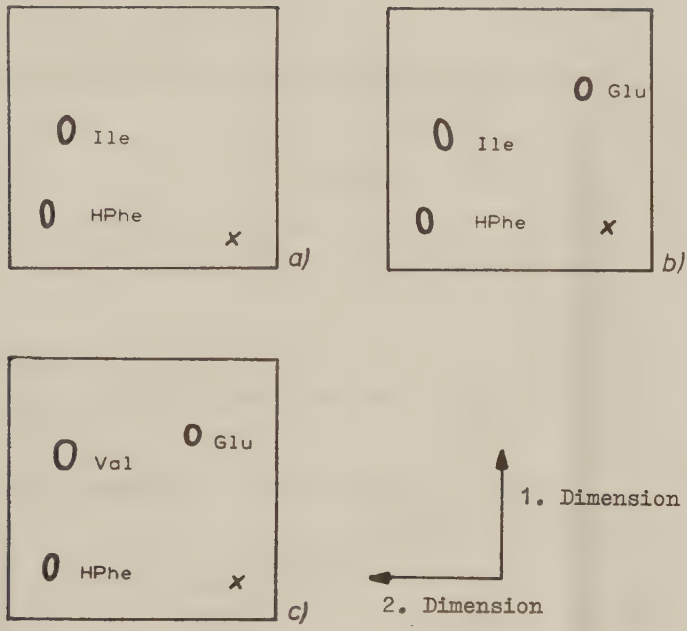


Abb. 56: Zweidimensionale Chromatogramme der Aminosäuren-Dansylderivate der Sequenzermittlung von (a) BC 2 und (b) BC 5, sowie (c) von BC 6
Fließmittel: 1. Dimension: System V
2. Dimension: System VI; X = Start

5.4. NMR-Spektren von BC 2, 5 und 6

Die durch GC, GC-MS, FD-MS und Edman-Abbau gefundenen Strukturen der Antibiotika wurden durch die ^{13}C- und ^{1}H-NMR-Spektren bestätigt; es traten keine zusätzlichen Signale auf, die auf das Vorhandensein weiterer Molekülgruppen hätten deuten können.

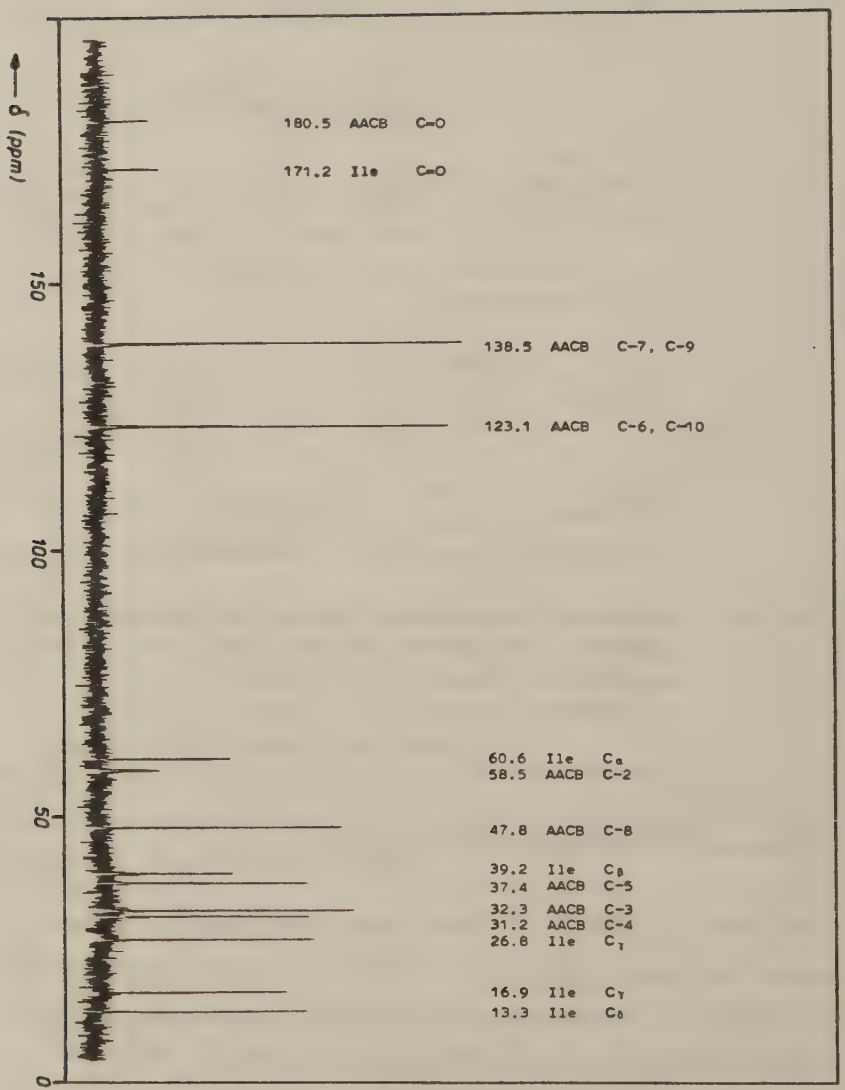


Abb. 57: ^{13}C-NMR-Spektrum von BC 2 (100,6 MHz;25 °C; D_2O).

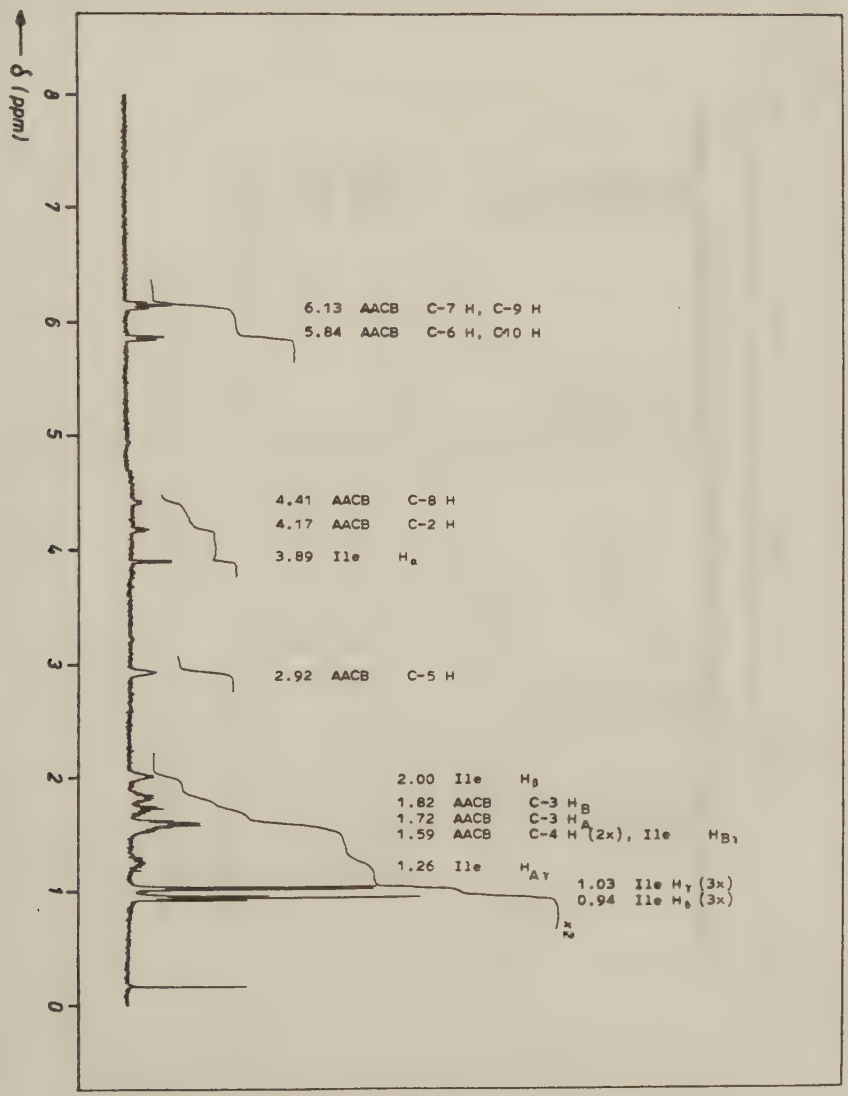


Abb. 58: ^{1}H-NMR-Spektrum von BC 2(400,13 MHz; 25 °C; D_2O).

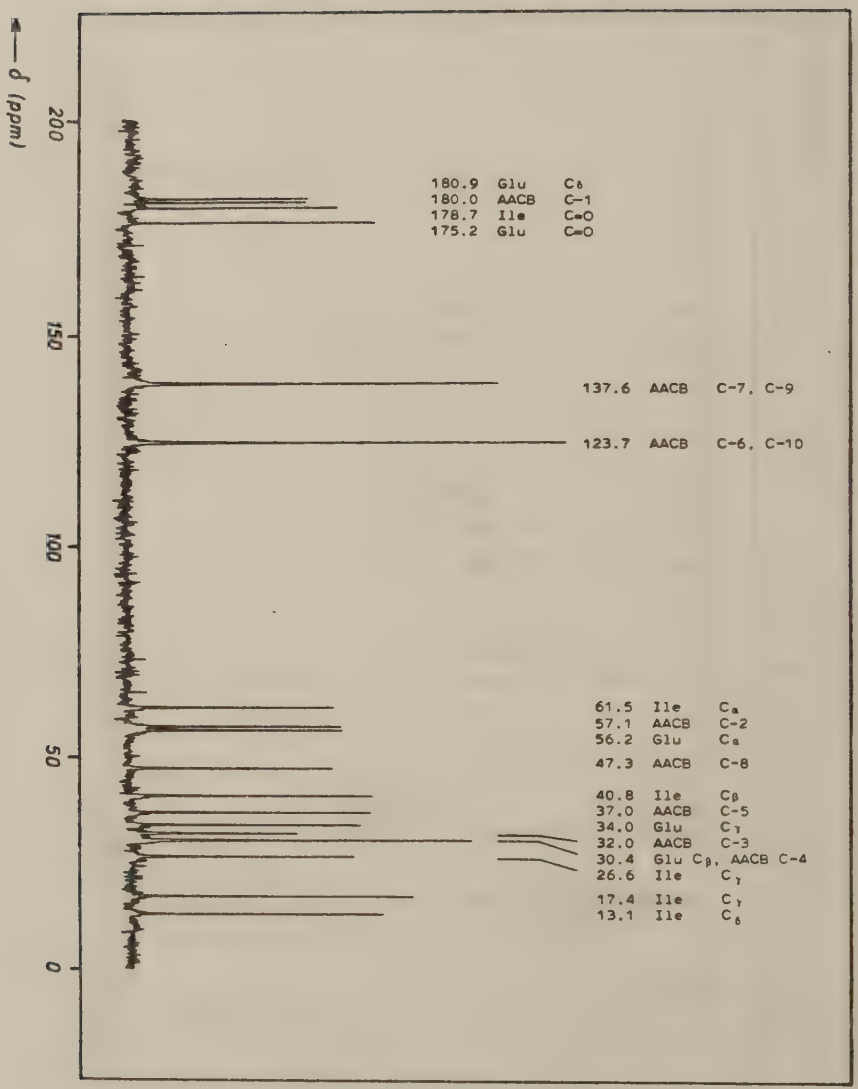


Abb. 59: ^{13}C-NMR-Spektrum von BC 5 (100,6 MHz; 25 °C; D_2O).

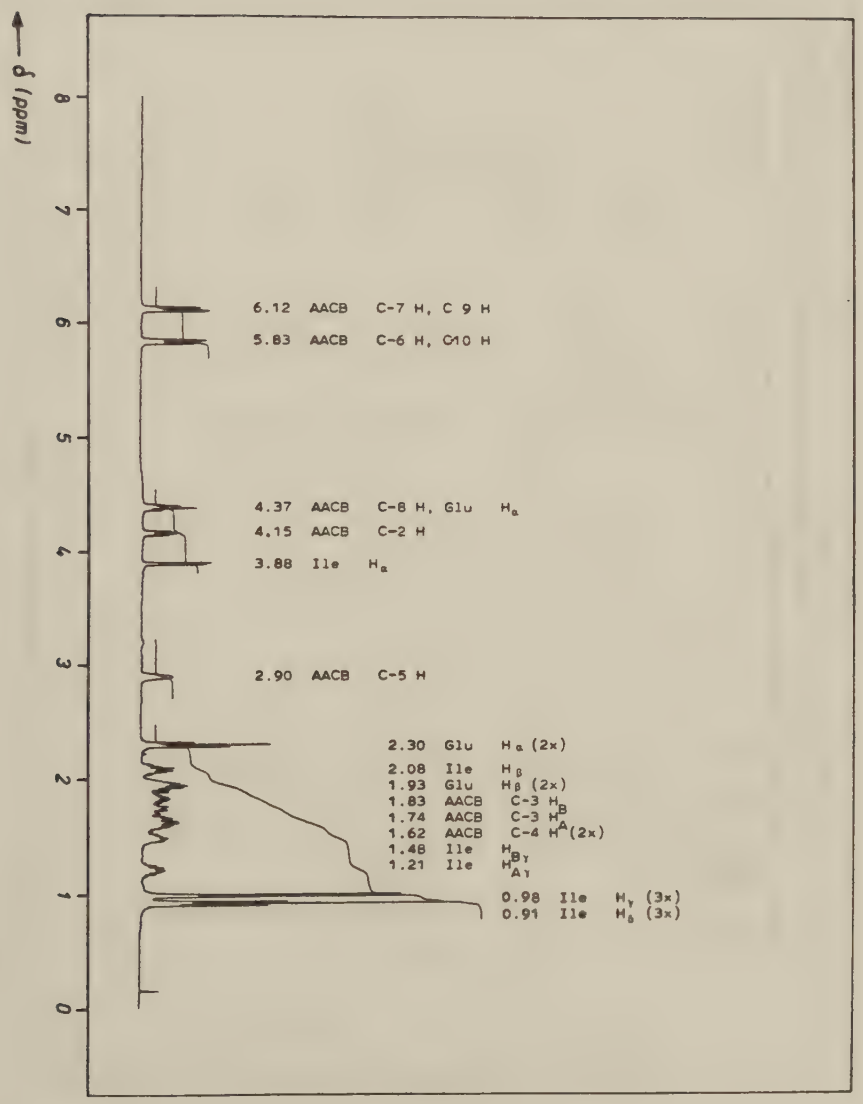


Abb. 60: ^{1}H-NMR-Spektrum von BC 5 (400,13 MHz; 25 °C; D_2O).

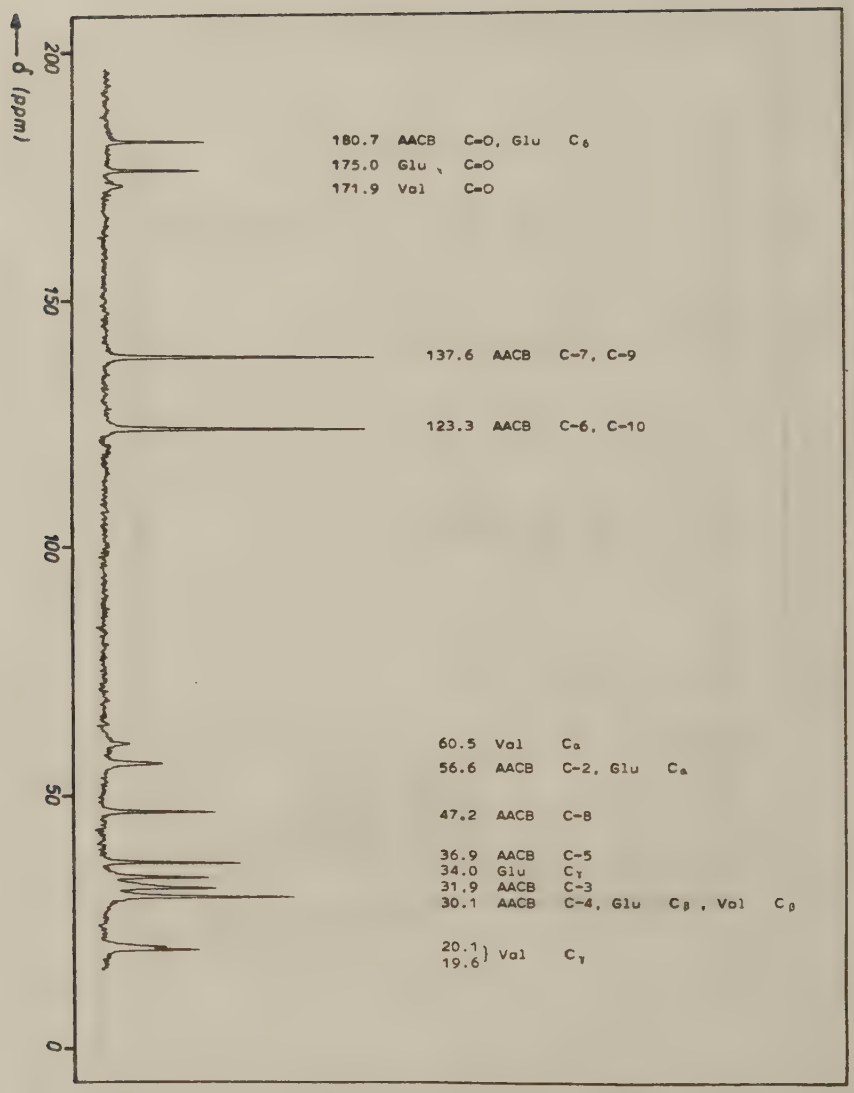


Abb. 61: ^{13}C-NMR-Spektrum von BC 6 (20,115 MHz; 25 °C; D_2O).

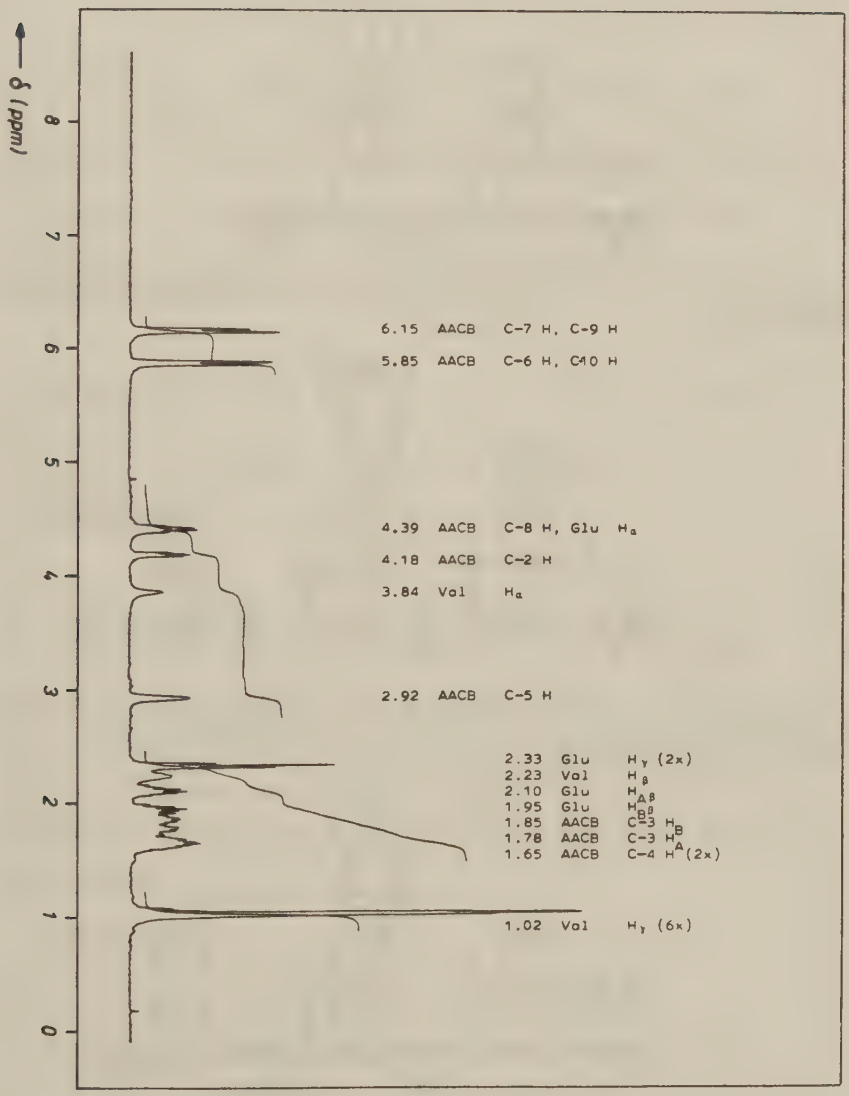
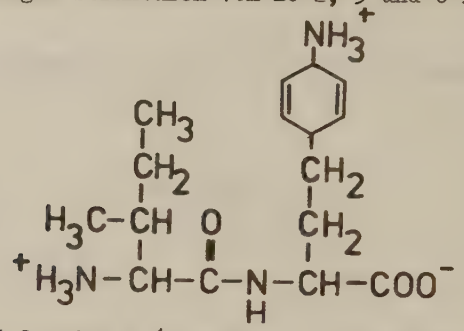
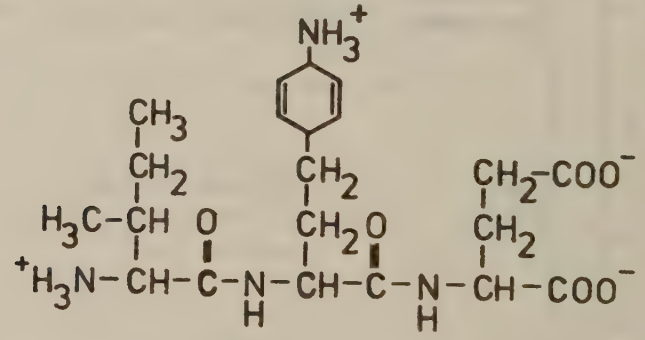


Abb. 62: ^{1}H-NMR-Spektrum von BC 6 (400,13 MHz; 25 °C; D_2O).

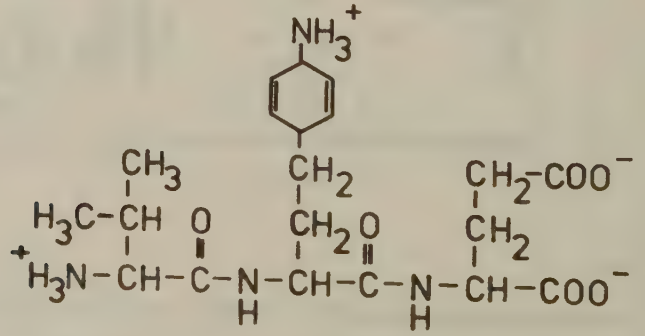
Die vollständigen Strukturen von BC 2, 5 und 6 lauten somit



L-Isoleucyl-L-2-amino-4-(4'-amino-2',5'-cyclohexadienyl)-butansäure (BC 2)



L-Isoleucyl-L-2-amino-4-(4'-amino-2',5'-cyclohexadienyl)--butanoyl-L-glutaminsäure (BC 5)



L-Valyl-L-2-amino-4-(4'-amino-2',5'-cyclohexadienyl)-butanoyl-L-glutaminsäure (BC 6)

6. INFRAROT-SPEKTROSKOPIE

Das Auftreten von Absorptionsbanden in definierten Bereichen des IR-Spektrums läßt auf die Anwesenheit bestimmter funktioneller Gruppen im Molekül schließen. Solche charakteristischen Gruppenfrequenzen ermöglichen Aussagen über Strukturelemente, die bei der Konstitutionsaufklärung unbekannter Substanzen dienlich sein können.

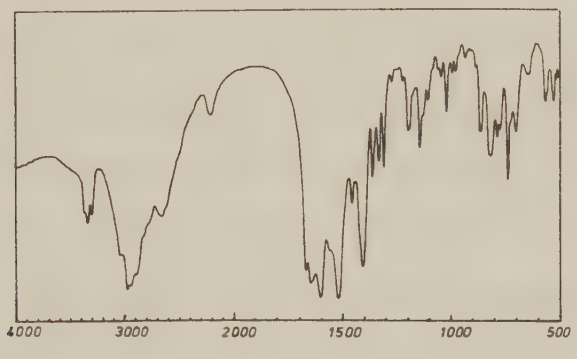
So zeigen die Spektren der isolierten Wirkstoffe die für Aminosäuren und Peptide typischen Banden von NH-Valenzschwingung (3500-3100 cm^{-1}), Amid I (1740-1600 cm^{-1}) und Amid II (1630-1500 cm^{-1}).

Das Infrarotspektrum von 1,4-Cyclohexadien wurde erstmals von GERDING und HAAS (34) beschrieben. STIDHAM (35) untersuchte das Schwingungsverhalten dieses Moleküls und ordnete den Schwingungen einzelne Frequenzen zu. In Tabelle 17 sind charakteristische Absorptionsfrequenzen von 1,4-Cyclohexadien entsprechenden Frequenzen der isolierten Wirkstoffe gegenübergestellt.

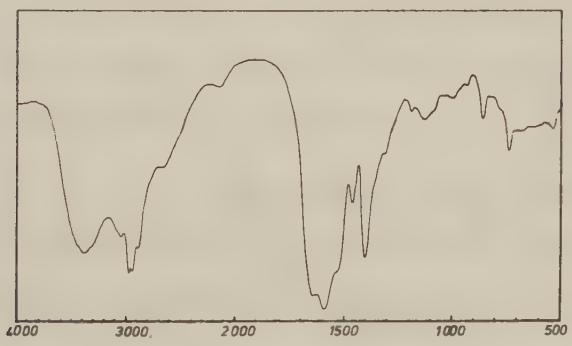
Tab. 17: Zuordnung charakteristischer Frequenzen im unsubstituierten 1,4-Cyclohexadien-System sowie in den Wirkstoffen BC 1 bis 6 (Wellenzahlen in cm^{-1}).

Schwingungsart	1,4-Cyclo-hexadien	BC 1	BC 2	BC 3	BC 4	BC 5	BC 6
Ring-Atmungsfrequenz	854	860	860	860	860	855	865
=CH-Streckschwingung	3032	3040	3040	3040	3070	3030	3040
Ringdeformationsschwingung	530	520	530	540	550	530	535
Ring-C=C-Streckschwingung	1639	1650	1640	1650	1660	1660	1660
Ring-HC=CH-Spreizschwingung ("in plane")	1197	1195	1190	1190	1190	1185	
Ring-HC=CH-Spreizschwingung (" out of plane")	985	990	1000	1000	990	985	985
Ring-Streckschwingung	1377	1360	1360	1360	1360	1350	1350

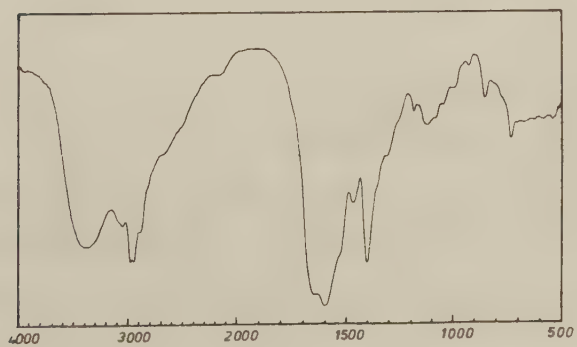
Nachfolgend werden IR-Spektren der Wirkstoffe BC 1 bis 6 aufgeführt (Wellenzahlen in cm^{-1}):



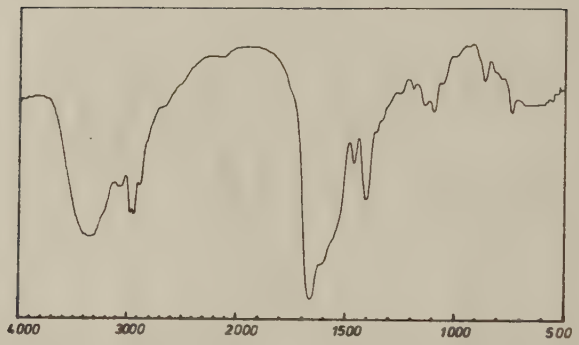
BC 1



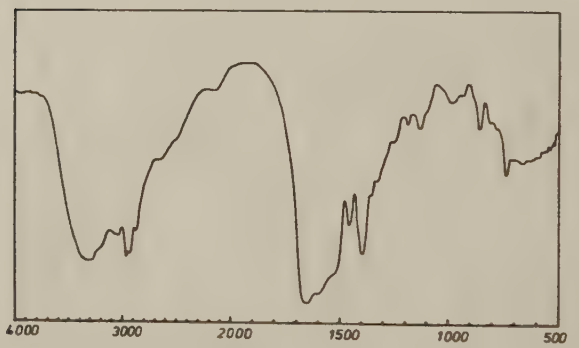
BC 2



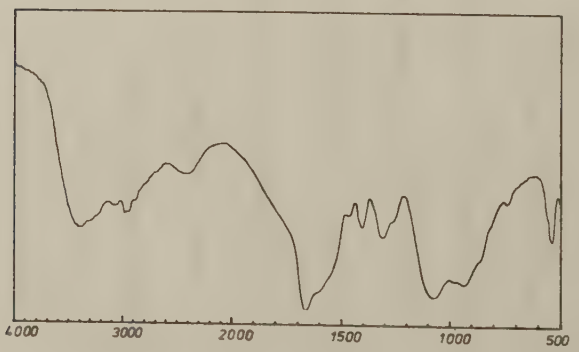
BC 3


4000
3000
2000
1500
1000
500

BC 4


4000
3000
2000
1500
1000
500

BC 5


4000
3000
2000
1500
1000
500

BC 6

7. CIRCULARDICHROISMUS

Durch Messung des Circulardichroismus, der Eigenschaft einer chiralen Verbindung, links- und rechtszirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark zu absorbieren, lassen sich Aussagen zur Stereochemie dieser Verbindung machen. Aussagekräftig sind dafür das Vorzeichen, die Größe und die Feinstruktur des Cotton-Effektes.

Die Wirkstoffe BC 1 - 5 zeigen im CD-Spektrum (Abb.63) einen negativen Cotton-Effekt mit einem Maximum bei 210 - 220 nm, wie er häufig bei Di- und Tripeptiden beobachtet wird. Diese Bande entspricht dem $n-\pi^*$-Übergang des Carbonylchromophors. BC 6 zeigt keinen meßbaren Cotton-Effekt.

Interessant ist die Differenzierungsmöglichkeit der Wirkstoffe anhand ihres CD-Spektrums in die Dipeptidantibiotika BC 1 bis 3 einerseits und die Tripeptidantibiotika BC 4 und 5 andererseits. Während erstere C-terminal den Grundkörper L-AACB enthält, besitzt die zweite Gruppe C-terminale Glutaminsäure.

Für cyclische Monoolefine wurde eine Oktantenregel (36,37) aufgestellt, die das Vorzeichen des Cotton-Effektes aus der Geometrie der Alkene erklären sollte. Sie erwies sich jedoch als nicht aussagekräftig (38). Nach einer anderen Regel (39)

bestimmen die quasiaxialen allylständigen Wasserstoffatome den Cotton-Effekt. Eine allgemeingültige Regel, die den beobachtbaren Cotton-Effekt mit der Stereochemie eines nichtkonjugierten Cycloalkens verknüpft, ist bis heute noch nicht aufgestellt.

Eine mögliche Ursache für diesen komplizierten Zusammenhang ist in der Beteiligung mehrerer Übergänge am Zustandekommen der längstwelligen CD-Bande zu suchen. Diese Bande hat bei nichtkonjugierten Olefinen im wesentlichen $\pi\sigma^*$-Charakter, doch sind auch $\pi\pi^*$-Übergänge möglich (40).

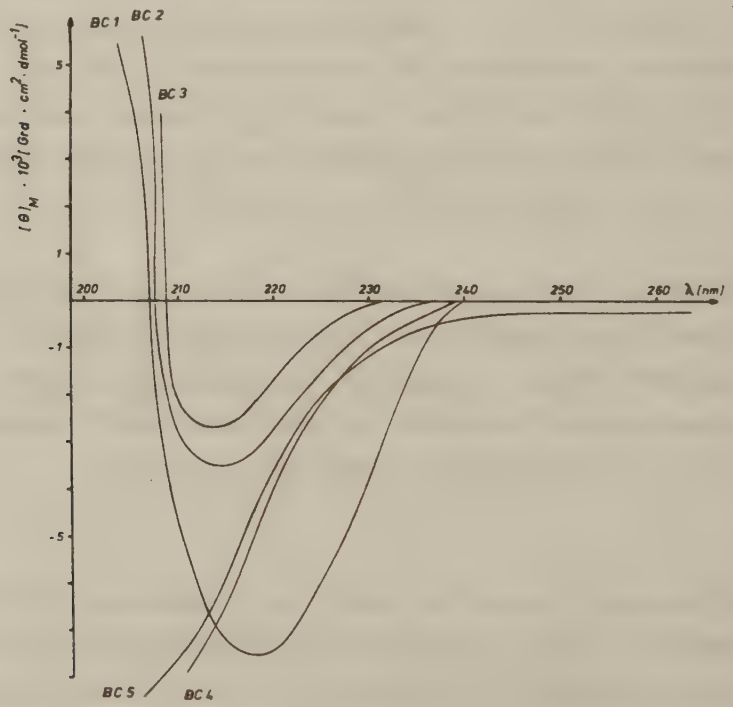


Abb. 63: CD-Spektren von BC 1 bis 5 ($c=10^{-2}$ mol/l, Wasser pH=7).

8. ULTRAVIOLETTABSORPTIONS-SPEKTROSKOPIE

Das UV-Absorptionsspektrum der sechs Wirkstoffe zeigt lediglich Endabsorption mit einem Maximum bei 217 nm (Abb.64). Diese Bande resultiert aus $n \rightarrow \pi^*$-Übergängen der Carbonyl-Gruppen.

Da sich eine Homokonjugation im Cyclohexadien(1,4)-System kaum bemerkbar macht (41), entspricht die Absorptionsbande des Diens der eines Monoolefins, mit einem Maximum bei 180 nm.

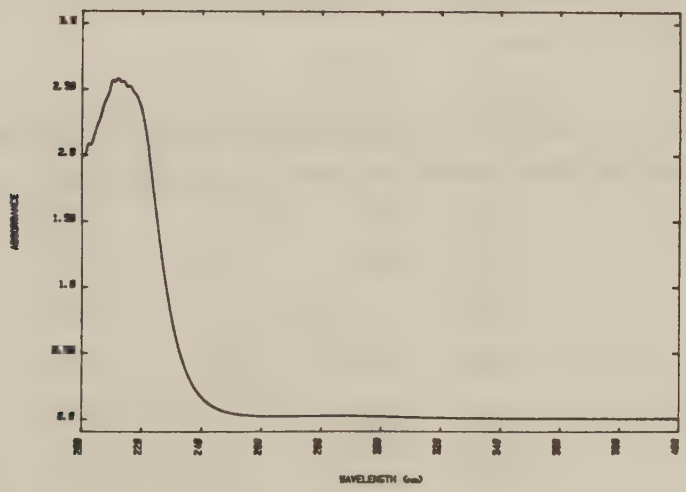


Abb. 64: UV-Spektrum der Substanz BC 1
Die identischen Spektren von BC 2 - 6 wurden nicht abgebildet.

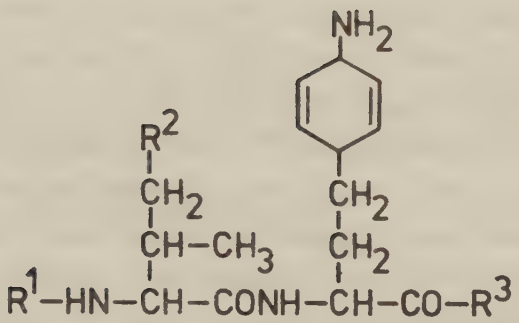
9. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DER STRUKTUR-UNTERSUCHUNGEN

Bei den sechs isolierten Wirkstoffen handelt es sich um Di- und Tripeptide, deren gemeinsamer Bestandteil die Aminosäure L-AACB bildet.

Ihre Charakterisierung erfolgte durch Interpretation der ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Daten und Auswertung von Massenspektren (FD-MS, GC-MS).

Die Konfigurationsbestimmung der Aminosäuren im Hydrolysat der Wirkstoffe ergab im Vergleich mit racemischen Proben stets die L-Form.

Die Sequenzierung der Peptide gelang mittels Dansyl-Edman-Abbau der hydrolytisch gebildeten Homophenylalanin-Peptide.



	R^1	R^2	R^3
BC 1	CH_3	CH_3	OH
BC 2	H	CH_3	OH
BC 3	CH_3	H	OH
BC 4	CH_3	CH_3	Glu
BC 5	H	CH_3	Glu
BC 6	H	H	Glu

Schema 8: Zusammenfassung der Konstitutionen der Wirkstoffe BC 1 bis 6.

Nachdem die vollständige Strukturbestimmung aller sechs Wirkstoffe vorlag, ergab eine Durchsicht der Literatur, daß die Verbindungen BC 1 und 3 als Stravidin S_2 und S_3 schon beschrieben waren (42-45). Der Grundkörper der sechs Substanzen, L-AACE, war von OKAMI (46) aus Kulturfiltrat von Streptomyces lavendulae isoliert und charakterisiert worden. Dieses Aminosäureantibiotikum, als Amiclenomycin (Acm) bezeichnet, ließ sich in seiner Wirkung durch Vitamin H (Biotin) aufheben. Dasselbe Aufhebungsmuster zeigen auch Stravidin S_2 und S_3 (43). Von keinem dieser Antibiotika war jedoch ein Vitamin E-Antagonismus beschrieben worden. Dieser Antagonismus erregte ursprünglich besonderes mikrobiologisches Interesse und differenzierte BC 1 - 6 von beschriebenen Wirkstoffen.

Eine sorgfältige Überprüfung des Vitamin E-Antagonismus ergab erst später, daß nicht Vitamin E, sondern eine Biotin-Kontamination der für die Tests verwendeten Vitamin E-Probe für die Aufhebung der Wirkung verantwortlich war (47).

Bei den vorliegenden Antibiotika handelt es sich ausschließlich um Vitamin H (Biotin)-Antagonisten. Die Wirkung von Biotin war bei der dieser Arbeit vorausgegangenen biologischen Charakterisierung der Wirkstoffe nicht getestet worden.

Als neue Wirkstoffe konnten dagegen die Biotin-Antagonisten BC 2, BC 4, BC 5 und BC 6 beschrieben werden.

Nachdem die isolierten Antibiotika BC 1 bis 6 nun als Amiclenomycin-Peptide erkannt waren, wurden sie wie folgt bezeichnet:

Antibiotikum	Bezeichnung	Kurzform
BC 1	N-Methylisoleucyl-Amiclenomycin	MeIle-Acm
BC 2	Isoleucyl-Amiclenomycin	Ile-Acm
BC 3	N-Methylvalyl-Amiclenomycin	MeVal-Acm
BC 4	N-Methylisoleucyl-Amiclenomycyl-Glutaminsäure	MeIle-Acm-Glu
BC 5	Isoleucyl-Amiclenomycyl-Glutaminsäure	Ile-Acm-Glu
BC 6	Valyl-Amiclenomycyl-Glutaminsäure	Val-Acm-Glu

Polypeptid BC L

Bei der Aufarbeitung des Kulturfiltrats fiel als Begleitstoff der niedermolekularen Wirkstoffe BC 1 - 6 ein Polypeptid (BC L) auf. Nach Abtrennung von BC 1 - 6 zeigte BC L keine antibiotische Wirkung mehr.

Eine gaschromatographische Analyse der Aminosäurenbestandteile von BC L ist in Abb. 65 wiedergegeben. Die gute Stöchiometrie auch in der Ionenaustauschchromatographie-Aminosäurenanalyse deutet auf einen bereits guten Reinheitsgrad dieses Präparats hin.

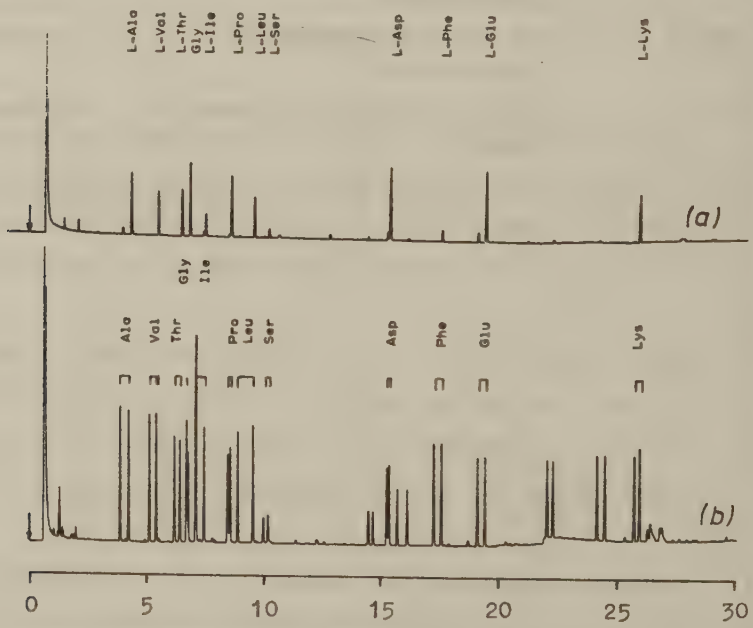


Abb. 65: Gaschromatographische Trennung der N-Pentafluoropropionyl-aminosäuren-n-propylester des Totalhydrolysats von (a) BC L und (b) einem Testgemisch.

Weitere biologische Untersuchungen (48) zeigten, daß BC L die Wirkung der niedermolekularen Wirkstoffe synergistisch verstärkt.

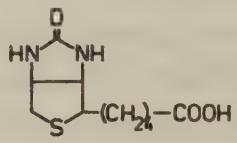
Auch bei der Isolierung von Stravidin S_2 und S_3 war ein größeres Polypeptid aufgefallen. Dieses Streptavidin genannte Peptid hatte eine Molmasse von 60 000 und wirkt als starker Biotin-Komplexbildner (49,50).

Bei dem isolierten Polypeptid BC L kann es sich aber nicht um Streptavidin handeln. BC L unterscheidet sich nicht nur in der Aminosäurenzusammensetzung, sondern auch in der Löslichkeit und in seinem Verhalten bei Dialyseversuchen, so daß eine Identität mit Stravidin ausgeschlossen werden kann. Eine Strukturaufklärung von BC L steht noch aus.

10. BIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN DER BIOTIN-ANTIMETABOLITEN BC 1 BIS 6

10.1. Biotin

KÖGL isolierte und charakterisierte 1936 eine Substanz, die er Biotin nannte (51).



Biotin (Vitamin H)

Biotin ist ein Cofaktor von Carboxylierungs- und Transcarboxylierungsreaktionen (52,53). Eine ausführliche Zusammenfassung über biotinabhängige Enzyme wurde von MOSS und LANE (54) veröffentlicht. Für eine große Anzahl Hefen, Pilzen und Bakterien ist Biotin lebensnotwendig. Bei Mensch und Tier führen Mangelerscheinungen zu einer progressiven Dermatitis, die an eine schuppende, desquamative Dermatitis des seborrhoeartigen Typus erinnert (55). In fortgeschrittenen Stadien ist diese von einer Alopezie und Pruritus begleitet. Biotingaben lassen das Krankheitsbild des Biotinmangels vollständig heilen.

Da Biotin in der Nahrung ausreichend vorhanden ist und außerdem in größeren Mengen von Darmbakterien gebildet wird, sind Mangelerscheinungen kaum zu beobachten.

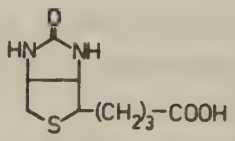
10.2. Antimetaboliten des Biotin

Durch Synthese biotinanaloger Substanzen, bei denen entweder der Thiophanring oder die Valeriansäureseitenkette verändert worden war, konnten Biotinantagonisten erhalten werden (Tab.18).

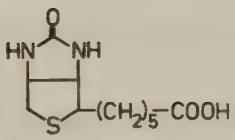
Die meisten dieser Verbindungen waren jedoch keine "absoluten" Antagonisten. Zwar besaßen sie für bestimmte Organismen eine deutliche Anti-Biotinwirkung, doch verhielten sie sich anderen Organismen gegenüber indifferent oder konnten Biotin sogar ersetzen. Es wurden auch mehrere natürliche Biotinantagonisten im Kulturfiltrat von Mikroorganismen gefunden (Tab.18).

Außer strukturähnlichen Antagonisten des Biotins gibt es Proteine, die Biotin irreversibel binden können. Zu diesen zählt Avidin (56) und das aus Streptomyces-Kulturen isolierte Streptavidin (57).

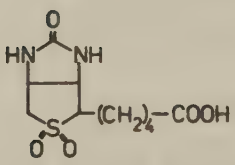
Tab. 18: Biotin-Antimetaboliten



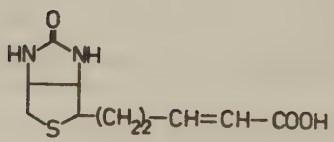
Norbiotin (58)



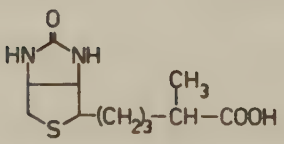
Homobiotin (58)



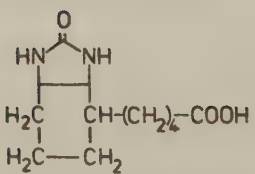
Biotinsulfon (59)



α-Dehydrobiotin (60)

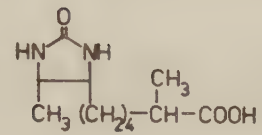


α-Methylbiotin (61)

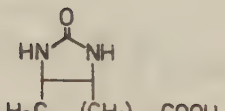


Ureylcyclohexylvaleriansäur
(62)

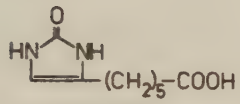
Tab. 18: Biotin-Antimetaboliten - Fortsetzung -



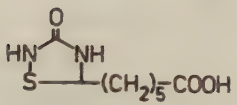
α-Methyldethiobiotin (61)



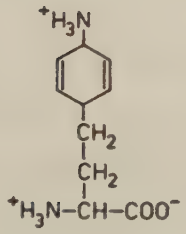
Dethiobiotin (63)



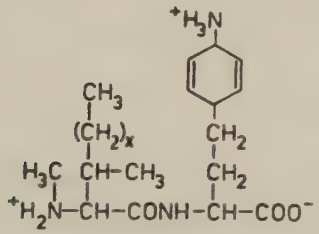
Imidazolidon(2)-4-capronsäure (64)



Acidomycin (65)



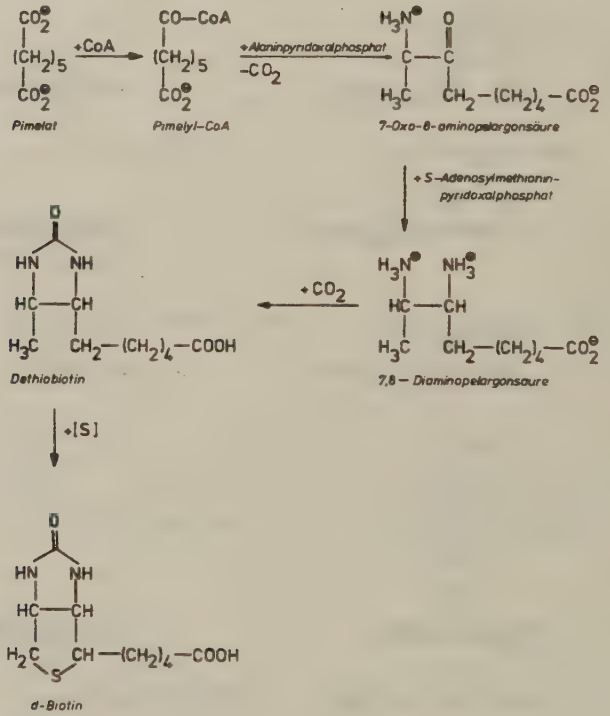
Amiclenomycin (46)



Stravidin S_2 (x=0)
Stravidin S_3 (x=1)
(42,43)

10.3. Untersuchung der biologischen Wirkung von Amiclenomycin

Man nimmt an, daß die Biosynthese von Biotin in Organismen nach folgendem Schema abläuft (66):



Schema 9: Biosynthese des Biotins

Die Wirkung von Amiclenomycin wird von Biotin, Dethiobiotin (DTB) und 7,8-Diaminopelargonsäure (DAPA) aufgehoben, nicht dagegen von 7-Keto-8-aminopelargonsäure (KAPA) und Pimelinsäure (67). In Gegenwart von Amiclenomycin akkumulierten die

untersuchten Mikroorganismen Mycobacterium smegmatis und Bacillus sphaericus KAPA, während die Bildung von DTB abnahm.

Daher wurde in Amiclenomycin ein Inhibitor der KAPA-DAPA-Transaminierung vermutet, der durch Blockierung dieser enzymatischen Reaktion die lebensnotwendige Biotinbiosynthese unterbindet.

Nach KITAHARA (67) ist auch zu vermuten, daß die Amiclenomycin enthaltenden Antibiotika, wie z. B. Stravidin S_2 und S_3, diese Transaminierungsreaktion und damit das Wachstum der Mikroorganismen hemmen.

10.4. Biologische Wirkung von BC 1 bis 6

10.4.1. Antibiotische Wirkung

Die Verbindungen BC 1 bis 6 hemmen das Wachstum zahlreicher Mikroorganismen, bevorzugt gramnegativer Bakterien (68). Bei grampositiven zeigen sie insbesondere bei Bacillus subtilis eine Wirkung. Das Wirkprofil im gramnegativen Bereich ist in Tabelle 19 wiedergegeben.

Tab. 19: Wirkprofil der Substanzen BC 1 bis 6
Die Zahlen geben die minimale Hemmkonzentration (µg/ml) im Verdünnungstest an.

Keim	Antibiotikum					
	1	2	3	4	5	6
Escherichia coli ATCC 11775 TEM	0,125	0,03	0,06	0,06	0,5	0,03
Escherichia coli 11775	0,25	0,007	0,125	0,06	0,125	0,03
Escherichia coli BC 29 ß	0,125	0,03	0,03	0,06	0,25	0,25
Pseudomonas aeruginosa BC 19	>64	>64	>64	64	16	32
Pseudomonas aeruginosa Hbg	>64	>64	>64	>64	>64	>64
Klebsiella pneumoniae ATCC 10031	0,06	0,007	0,06	0,25	0,125	0,5
Klebsiella pneumoniae 1082 E	8	0,5	1	0,5	0,5	1
Klebsiella pneumoniae BC 6	8	16	1	2	0,5	8
Serratia marcescens ATCC 13880	4	1	0,5	0,5	2	4
Serratia marcescens BC 8	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,125
Enterobacter cloacae ATCC 13047	4	4	8	4	2	4
Enterobacter cloacae P 99	0,015	0,03	0,125	0,6	0,125	0,5
Citrobacter freundii ATCC 11601	0,015	0,015	0,015	0,125	0,06	0,125
Proteus inconstans ATCC 25825	0,25	0,007	0,06	0,125	1	0,5
Acinetobacter calcoaceticus ATCC 11959	64	>64	64	32	16	32
Acinetobacter calcoaceticus ATCC 15473	64	>64	64	32	32	>64

10.4.2. Toxizität

Die akute Toxizität wurde durch perorale und subcutane Applikation der Wirkstoffe an Mäuse in steigenden Dosen bestimmt (68). Die Mäuse zeigten bei allen Substanzen bei subcutaner Applikation von jeweils 320 mg Antibiotikum pro kg Maus nach 7 Tagen Beobachtungszeit keine Reaktion. Ähnlich geringe akute Toxizitäten werden für Amiclenomycin (46) und Stravidin (45) berichtet.

10.4.3. Einfluß der Wirkstoffe BC 1 - 6 und BC L auf Lymphozyten-Proliferation

Die isolierten Peptid-Antibiotika BC 1 - 6 und das Polypeptid BC L wurden in einem Lymphozyten-Proliferationstest (69,70) auf mögliche hemmende oder stimulierende Wirkung hin untersucht (71).

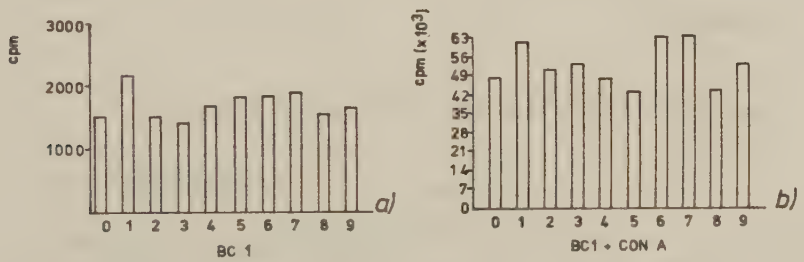


Abb. 66: Lymphozyten-Proliferationstest mit (a) BC 1 und (b) BC 1 mit CON A. Die nahezu identischen Ergebnisse von BC 2 - 6 und BC L sind nicht abgebildet.

Die Ergebnisse zeigen, daß keine signifikanten Wirkungen der Antibiotika auf Lymphozyten bestehen und auch toxische Aktivitäten ausgeschlossen werden können.

11. DERIVATE

Durch gezielte enzymatische und chemische Abwandlung der isolierten Wirkstoffe BC 1 bis 6 sollten Derivate synthetisiert werden, die Struktur-Wirkungsbeziehungen aufzeigen konnten. Durch Variation der funktionellen Gruppen und durch Abbaureaktionen sollten Teilstrukturen ermittelt werden, die für das Auftreten der beobachteten antibiotischen Wirkung essentiell sind.

11.1. Enzymatische Abbaureaktionen

Mit "Pronase P" aus Streptomyces griseus, einer Peptidase, über deren Spezifität keine Angaben vorliegen (72), wurde eine hydrolytische Spaltung der Di- und Tripeptide BC 1 - 6 versucht.

Tab. 20: Ergebnisse der Spaltung mit Pronase P

		Spaltung mit Pronase P	Spaltprodukte
Dipeptide	BC 1	-	-
	BC 2	+	Ile;Acm
	BC 3	-	-
Tripeptide	BC 4	-	-
	BC 5	+	Ile; L-Acm-L-Glu
	BC 6	+	Val; L-Acm-L-Glu

Der enzymatische Abbau von BC 2 (Ile-Acm) erfolgte quantitativ und lieferte durch Abspaltung der N-terminalen Aminosäure Isoleucin das Antibiotikum Amiclenomycin (73).

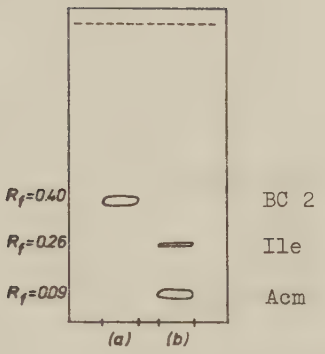


Abb. 67: Dünnschichtchromatogramm (System I) von BC 2 (Ile-Acm) vor Pronasebehandlung (a) und nach Pronasebehandlung (b).

Die enzymatische Hydrolyse von BC 5 (Ile-Acm-Glu) und BC 6 (Val-Acm-Glu) lieferte neben Ile bzw. Val den neuen biologisch aktiven Wirkstoff Acm-Glu (Laborbezeichnung BC 7).

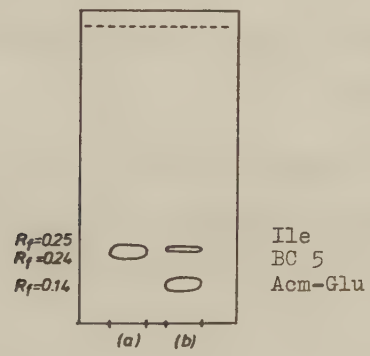
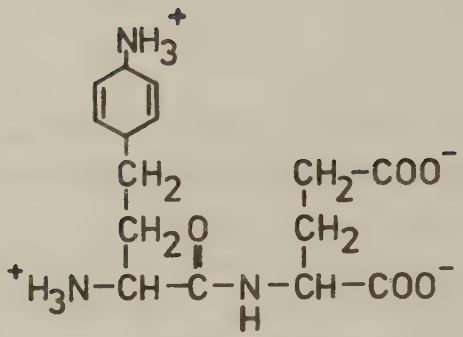


Abb. 68: Dünnschichtchromatogramm (System I) von BC 5
a) vor Pronasebehandlung,
b) nach Pronasebehandlung.



L-Acm-L-Glu (BC 7)

Mit dem Dipeptid Acm-Glu (BC 7) liegt nun ein Antibiotikum vor, in dem der wirksame Grundkörper erstmals N-terminal steht. Nach Enzymbehandlung von BC 1, BC 3 und BC 4 zeigten Dünnschichtchromatogramme neben den Ausgangsverbingungen keine weiteren Produkte. Ein enzymatischer Abbau durch Pronase P scheint somit nur an der N-terminalen Peptidbindung des Amiclenomycins (Acm) möglich zu sein, sofern N-terminale Proteinaminosäuren vorliegen.

Durch Darstellung des Amiclenomycins stand jetzt der Grundkörper der Antimetaboliten für Untersuchungen zur Verfügung. In Abb. 69 und 70 sind die ^{13}C- und ^{1}H-NMR-Spektren dieser Verbindung dargestellt.

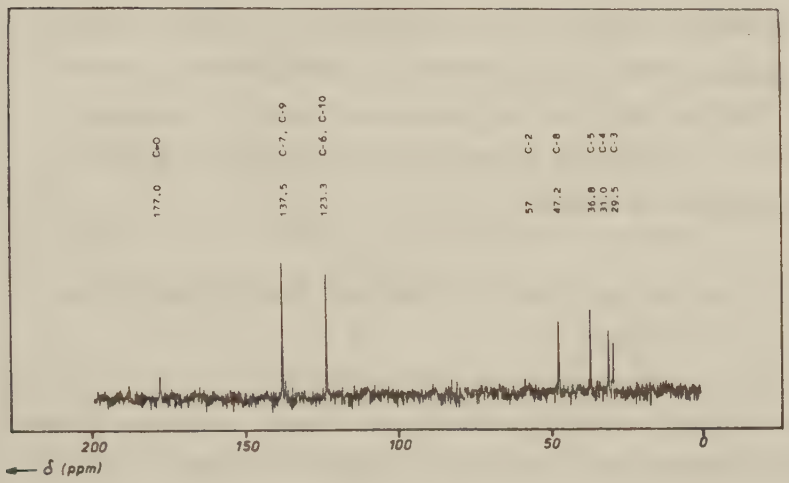


Abb. 69: ^{13}C-NMR-Spektrum von Amiclenomycin (D_2O,pH=7; 20,115 MHz; 25 °C).

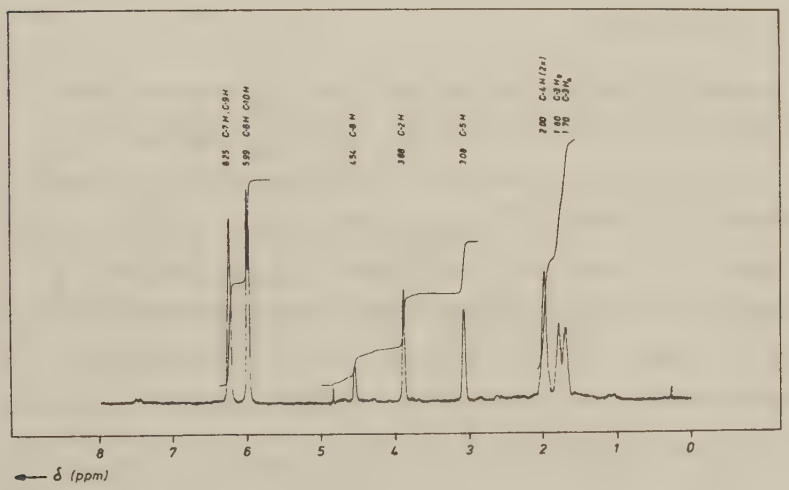


Abb. 70: ^{1}H-NMR-Spektrum von Amiclenomycin (D_2O,pH=7; 90 MHz; 25 °C)

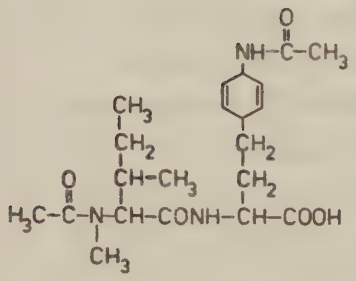
Amiclenomycin wirkte im Plattendiffusionstest stark hemmend auf E.coli. Diese Wirkung konnte mit Biotin aufgehoben werden. OKAMI et al., der als erster Amiclenomycin beschrieb, berichtete dagegen von einer ausschließlich gegen Mycobakterien gerichteten Wirkung.

11.2. Derivatisierung der Amino- und Carboxy-Funktionen der Peptide

Die folgenden Derivatisierungen wurden stellvertretend an den Antimetaboliten BC 1 (MeIle-Acm), einem Methylaminosäure enthaltenden Dipeptid, und an BC 5 (Ile-Acm-Glu), einem Tripeptid, das neben Amiclenomycin nur die Protein-Aminosäuren Isoleucin und Glutaminsäure enthält, durchgeführt.

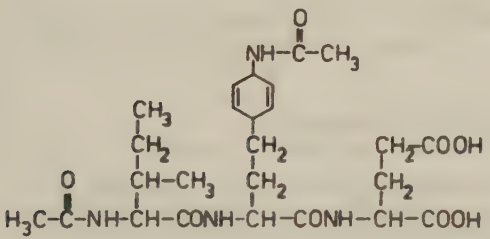
11.2.1. Acylierung

Die Aminogruppe der Peptide MeIle-Acm und Ile-Acm-Glu konnte in Pyridin quantitativ acyliert werden. Acyliertes BC 1 (R_F(I)=0,70) wurde nach präparativer Dünnschichtchromatographie spektroskopisch untersucht. Das ^{1}H-NMR-Spektrum wies zwei Acetylgruppen der chemischen Verschiebung 1.93 ppm (3H) und 1.98 ppm (3H) auf. Die Cyclohexa(1,4)dien-Struktur war erhalten (5.7 ppm, 4H), aber zu einem verbreiterten Triplett zusammengefallen. Das entstandene diacetylierte BC 1 zeigte keine biologische Aktivität mehr.



Ac-L-MeIle-L-Acm(Ac)

Durch die Acylierung von Ile-Acm-Glu (BC 5) war ebenfalls ein diacetyliertes ninhydrinnegatives Produkt entstanden (R_F(I)=0.72). Die Acetylgruppen sind durch ^{1}H-NMR-Signale bei 1.94 ppm (3 H) und 1.98 ppm (3 H) nachweisbar. Auch in diesem Derivat war das Dien-System erhalten geblieben. Wie bei MeIle-Acm (BC 1) zeigte das acylierte Produkt von Ile-Acm-Glu keine biologische Aktivität mehr.



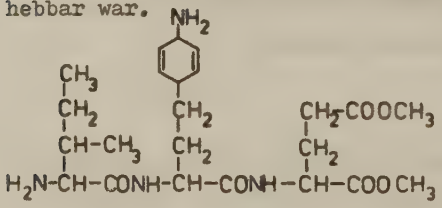
Ac-L-Ile-L-Acm(Ac)-L-Glu

11.2.2. Veresterung

Das mit Methanol sauer veresterte ninhydrinpositive Produkt von MeIle-Acm war sehr lipophil: R_F(I)=0.95. Das ^{1}H-NMR-Spektrum der gereinigten Probe zeigte die Methylester-Gruppe

bei 3.7 ppm (3 H) und für das olefinische System bei 5.8 ppm (4 H) ein Singulett. Biologisch war der Methylester von BC 1 (MeIle-Acm) nicht mehr aktiv. Da offensichtlich das Cyclohexadienyl-System nicht angegriffen war, muß untersucht werden, ob fehlender Transport in die Zelle für den Aktivitätsverlust verantwortlich ist (siehe S. 135).

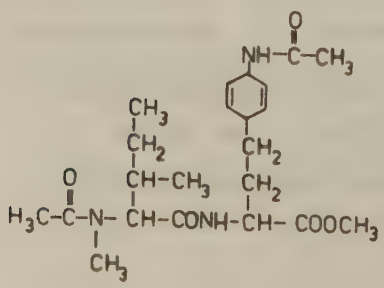
Die Veresterung von BC 5 (Ile-Acm-Glu) ergab ein ninhydrinpositives Derivat mit $R_F(I)=0.60$. Im ^{1}H-NMR-Spektrum fanden sich zwei Methylester-Signale bei 3.5 und 3.7 ppm. Das Cyclohexadiensystem war intakt geblieben. Abweichend von BC 1 wurde beim BC 5-Derivat weiterhin biologische Aktivität gefunden, die wie bei der Ausgangsverbindung mit Biotin aufhebbar war.



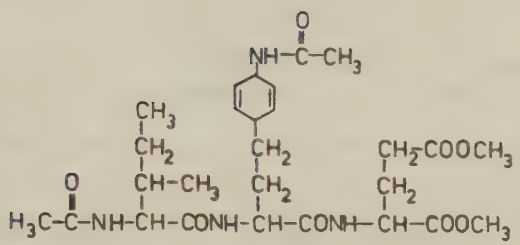
L-Ile-L-Acm-L-Glu(OMe)-OMe

11.2.3. N,N'-Diacetyl-peptid-methylester

Durch Acetylierung von MeIle-Acm und Ile-Acm-Glu in Methanol entstanden die Diacetyl-peptid-methylester von BC 1 und BC 5.



Ac-L-MeIle-L-Acm(Ac)-OMe

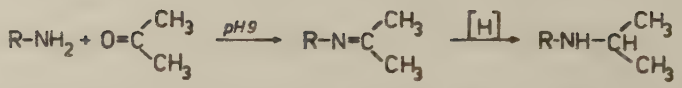


Ac-L-Ile-L-Acm(Ac)-
-L-Glu(OMe)-OMe

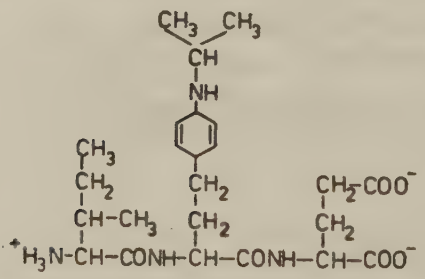
Der R_F-Wert der beiden vollgeschützten Peptide betrug 0.65 in System I. ^{1}H-NMR-Aufnahmen zeigten bei MeIle-Acm eine Acylierung mit zwei Acetylgruppen (1.98 ppm, 6 H) sowie die Anwesenheit einer OCH_3-Gruppe (3.7 ppm, 3 H). Das Cyclohexadienyl-System war erhalten geblieben.
Bei Ile-Acm-Glu bewies das entstandene Produkt zugleich erneut das Vorliegen von Glutaminsäure. Im ^{1}H-NMR-Spektrum ergab die Integration zwei Methylestergruppen (3.3 ppm, 6 H) und zwei Acetylgruppen (1.8 ppm (3 H) und 1.85 ppm (3 H)).
Beide N,N'-Diacetyl-peptid-methylester-Derivate waren bei E.coli biologisch nicht wirksam.

11.2.4. N-Alkylierung der Wirkstoffe

MEANS und FEENEY (74) berichteten, daß Proteine durch Behandlung mit aliphatischen Aldehyden oder Ketonen und Natriumborhydrid in die entsprechenden Mono- oder Dialkylderivate umgewandelt werden. Diese Methode wurde hauptsächlich auf die ε-Aminogruppe von Lysin angewandt. Es sollte versucht werden, ob sich damit auch eine Alkylierung der η-ständigen Aminogruppe von Amiclenomycin erreichen ließe.



Die Reaktion wurde stellvertretend an Ile-Acm-Glu durchgeführt. Im ^{1}H-NMR-Spektrum des mittels präparativer Dünnschichtchromatographie gereinigten Derivats zeigten sich deutlich die Signale von zwei zusätzlichen Methylgruppen (1.1 ppm (3 H) und 1.2 ppm (3 H)). Dies belegte die erfolgreiche Alkylierung einer Aminogruppe. Das Cyclohexadien-System blieb bei dieser Reaktion erhalten. Das N-alkylierte Ile-Acm-Glu zeigte jedoch im Plattendiffusionstest an E.coli keine antibiotische Aktivität.



L-Ile-L-Acm(iPr)-L-Glu

11.3. Derivatisierungen des Cyclohexa(1,4)dien-Systems von Amiclenomycin

Zur weiteren Modifikation der Wirkstoffe bot sich das ungesättigte System der Aminosäure Amiclenomycin zu Derivatisierungen an. Es wurden folgende Reaktionen ausgeführt: Oxidationen mit Permanganat und Persäure, thermischer Abbau, Hydrierung und Halogenierungen.

11.3.1. Oxidation

Der Grundkörper von Amiclenomycin, das Cyclohexa(1,4)dien, ist eine sehr reaktive instabile Gruppierung, die zur Polymerisation neigt. Das 1,4-Dien ist nur im Dunkeln unter Stickstoff eine stabile Verbindung. Eine Oxidation mit Permanganat (75,76) führt zu stereoisomeren Cyclohexan-1,2,4,5-tetrolen. Perbenzoesäure ergibt zuerst 1,2-Epoxycyclohex-4-en und dann 1,2,4,5-Diepoxycyclohexan (75,77).

11.3.1.1. Oxidation mit Permanganat

Bei der Oxidation von Ile-Acm-Glu mit Kaliumpermanganat erhielt man eine sehr polare Verbindung ($R_F(I)=0.05$), die im ^{1}H-NMR-Spektrum keine olefinischen Protonen mehr aufwies. Der biologische Test ergab für dieses Oxidationsprodukt keine antibiotische Wirksamkeit.

11.3.1.2. Epoxidierung mit m-Chlorperbenzoesäure

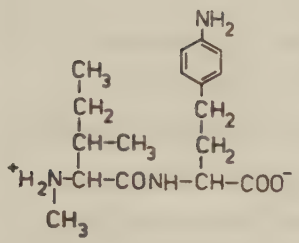
Bei dieser Reaktion (78) entstand aus MeIle-Acm ein ninhydrinpositives Derivat (R_F(III)=0.07). Eine Strukturbestimmung liegt noch nicht vor.
Im Plattendiffusionstest zeigte das Derivat keine Aktivität.

11.3.2. Thermischer Abbau

Im Rahmen der Strukturaufklärung war dieser Abbau in wässriger Lösung genauer untersucht worden. Durch Hydrolyse (110 °C, 90 min) erhielt man jeweils ninhydrinnegative Derivate: BC 1-Derivat R_F(I)=0.63, BC 5-Derivat R_F(I)=0.59. In den ^{1}H-NMR-Spektren dieser Derivate trat übereinstimmend ein Signal aromatischer Protonen bei 7.3 ppm (5 H) auf. Beide so gebildeten Homophenylalanin-Derivate zeigten keine Aktivität gegen E.coli.

11.3.3. Hydrierung

Unter starker Kühlung disproportioniert 1,4-Cyclohexadien in Gegenwart von Palladium oder Platin zu Benzol und Cyclohexan; bei Raumtemperatur verläuft diese Reaktion explosionsartig (79). Das bei der "Hydrierung" von MeIle-Acm mit Wasserstoff an Palladium/Aktivkohle erhaltene ninhydrinpositive Produkt (R_F(I)=0.43) erwies sich bei der spektroskopischen Untersuchung als p-Aminohomophenylalanyl-N-methylisoleucin. Bei dieser Reaktion war also keine Hydrierung, sondern eine Aromatisierung (Dehydrierung) des Ringsystems eingetreten. Die Integration ergab vier aromatische Protonen (7.3 ppm, 4 H).



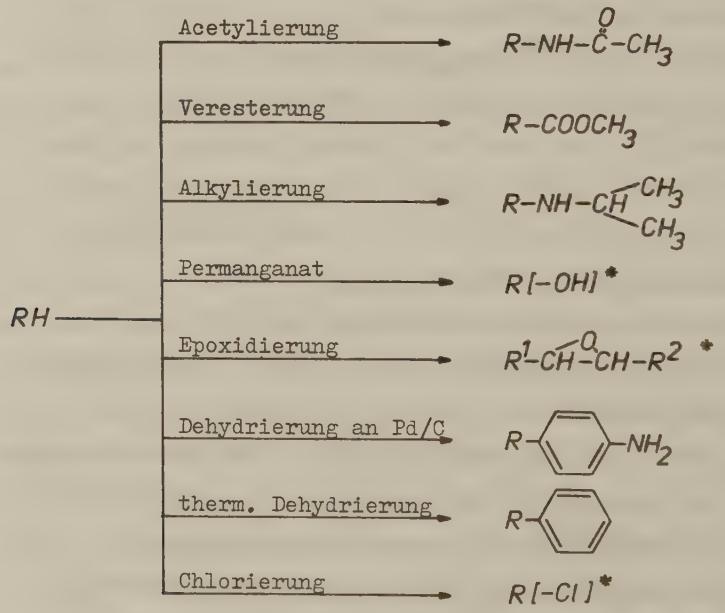
MeIle-HPhe(NH_2)

11.3.4. Halogenierung

Setzt man 1,4-Cyclohexadien mit Brom um, so bildet sich zunächst 4,5-Dibromcyclohex-1-en, das zu zwei stereoisomeren 1,2,4,5-Tetrabromocyclohexan-Derivaten weiterreagiert (77). BC 1 und 5 zeigten keine Umsetzung mit wässriger Iodlösung. Bei der Chlorierung erfolgte dagegen eine quantitative Umsetzung, die nach 10 Minuten abgeschlossen war. Das ^{1}H-NMR-Spektrum des chlorierten Wirkstoffs MeIle-Acm zeigt keine olefinischen Protonen mehr. Dafür treten deutlich zwei Signale bei 3.6 ppm zusätzlich auf. Diese chemischen Verschiebungen liegen in einem Bereich, wie er für Signale chlorierter Cycloalkane beschrieben ist.
Die Chlorierung von Ile-Acm-Glu ergibt ein ähnliches Bild. Die Signale der olefinischen Protonen fehlen, dagegen treten neue Signale bei 3.55 und 3.65 ppm auf. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß bei der Chlorierung Tetrachlorocyclohexan-Derivate gebildet wurden. Eine nähere Untersuchung der Struktur und Stereochemie dieser Derivate steht noch aus.
Ein überraschendes Ergebnis lieferten die Aktivitätsuntersuchungen dieser Derivate. Im biologischen Test zeigte das chlorierte Derivat von MeIle-Acm eine wesentlich verstärkte

Wirkung gegen E.coli. Die Wirkung von chloriertem Ile-Acm-Glu entsprach der Aktivität der Ausgangsverbindung. In beiden Fällen konnte aber diese antibiotische Wirkung durch Biotin nicht mehr aufgehoben werden. Dies spricht für einen völlig anderen Wirkmechanismus dieser beiden Derivate. Auf eine spekulative Interpretation dieser Ergebnisse wird daher vor Beendigung weiterer Versuche vorerst verzichtet.

In Schema 10 und 11 sind die durch chemische Abwandlungen und enzymatischen Abbau erhaltenen Derivate der Wirkstoffe zusammenfassend aufgeführt:



Schema 10: Chemische Derivate der Wirkstoffe.
(* Strukturbestimmung steht noch aus)

Ile-Acm (BC 2) —Pronase P→ Acm + Ile

Ile-Acm-Glu (BC 5) —Pronase P→ Acm-Glu + Ile

Val-Acm-Glu (BC 6) —Pronase P→ Acm-Glu + Val

Schema 11: Enzymatisch erhaltene Derivate der Wirkstoffe

11.4. Analyse essentieller Wirkstrukturen der Antibiotika

Die enzymatische Hydrolyse ergab, daß die für die biologische Wirkung erforderlichen Strukturelemente in der Aminosäure Amiclenomycin zu suchen sind. Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch die Variation der neben Amiclenomycin gefundenen Aminosäuren Ile, Val, Glu, MeIle und MeVal. Die Wirkung aller charakterisierten Di- und Tripeptide (BC 1 bis 7) konnte wie beim Grundkörper Amiclenomycin mit Biotin aufgehoben werden. Auch die Stellung von Amiclenomycin im Peptid kann keinen Einfluß auf die antibiotische Aktivität haben. So kommt Amiclenomycin N-terminal (BC 1 und 3), C-terminal (BC 7) und in der Mittelposition (BC 4, 5 und 6) von Tripeptiden vor. Die Aktivität der Tripeptide beweist zusätzlich, daß eine Derivatisierung der α-Amino- und der Carboxy-Funktion von Amiclenomycin ohne Aufhebung der Wirkung möglich ist.

Eine für die antibakterielle Wirkung essentielle Teilstruktur ist der Cyclohexadien-Ring. Mit der Aromatisierung dieses Olefins - unter Erhalt oder Verlust der η-ständigen

Aminogruppe - war stets ein vollständiger Aktivitätsverlust der Antibiotika verbunden. Dieses ungesättigte System ist neben einer freien η-ständigen Aminogruppe für die beobachtete biologische Wirkung verantwortlich.

12. TRANSLOKATION DER WIRKSTOFFE DURCH DIE ZELLMEMBRAN VON E.COLI

12.1. Oligopeptidtransportsysteme bei E.coli

Die cytoplasmatische Membran gramnegativer Bakterien wie z.B. E.coli stellt für Aminosäuren und Peptide eine Barriere dar. Um diese hydrophilen Moleküle dennoch nutzen zu können, existieren spezifische Transportsysteme. So sind bei E.coli K 12 separate Transportsysteme für Oligo- und Dipeptide beschrieben worden. Diese Systeme weisen unterschiedliche Spezifitäten auf (80-82). Die wichtigsten strukturellen Anforderungen an beide Systeme sind (80):

1) Die α-Aminogruppe darf monoalkyliert, nicht aber dialkyliert oder acyliert sein.
2) Es müssen α-Peptidbindungen vorliegen.
3) Die Aminosäuren müssen in der L-Konfiguration vorliegen, da Stereospezifität besteht.

Die Natur der Seitenkette ist nicht von Bedeutung. Beim Tripeptidtransportsystem kann z. B. die C-terminale α-Carboxy-Gruppe substituiert sein oder ganz fehlen. Demgegenüber ist

die Spezifitätsanforderung des Dipeptidtransportsystems strenger. Dipeptide müssen eine freie C-terminale Carboxy-Gruppe aufweisen. Ist diese derivatisiert oder fehlt sie ganz, so kann eine Aufnahme nur noch über das Oligopeptidsystem erfolgen.

Die Spezifität der Peptidtransportsysteme erklärt das biologische Verhalten einiger Derivate von MeIle-Acm und Ile-Acm-Glu. So ist der völlige Aktivitätsverlust acylierter Derivate allein auf einen fehlenden Transport in die Zelle zurückzuführen. Ausbleibende Wirkung darf in diesem Falle nicht dem Verlust einer essentiellen Wirkstruktur zugeschrieben werden. Durch Alkylierung der η-ständigen Aminogruppe von Amiclenomycin ist der Transport durch die Cytoplasmamembran dagegen weiterhin gewährleistet, da monoalkylierte Derivate vom Peptidtransportsystem toleriert werden. Da trotzdem ein Verlust der antibakteriellen Wirkung beobachtet wird, muß daraus geschlossen werden, daß durch Alkylierung der Aminogruppe von Amiclenomycin eine antibiotische Wirkung im Innern der Zelle nicht mehr zustande kommt. Dies bedeutet, daß eine freie η-ständige Aminogruppe am Amiclenomycin für die biologische Aktivität erforderlich ist.

12.2. Vehicle-warhead-Modell

Ein Weg zur Synthese neuer Hemmstoffe war das "Vehicle-warhead"-Konzept ("illicit transport", "smuggling concept") (83-85). Eine toxische Substanz (warhead), die von Mikroorganismen nicht aufgenommen wird, sollte durch Kupplung an ein Peptid (vehicle) über das Oligopeptidtransportsystem in die Zelle

eingeschmuggelt werden. Erfolgt intrazellulär eine schnelle enzymatische Spaltung von warhead und vehicle, so ist ein Rückfluß von warhead aus der Zelle nicht mehr möglich. Substanzen, die die Anforderung des vehicle-warhead-Konzepts erfüllten (9,86,87) zeichneten sich deshalb im Vergleich zum Hemmstoff allein durch eine erheblich niedrigere minimale Hemmkonzentration aus. Zudem wurde häufig ein erweitertes Wirkspektrum beobachtet.

Dieses Konzept führte u.a. zur Synthese einiger Di- und Tripeptid-Analoga von verschiedenen Wirkstoffen (88-91).

Als in der Natur vorkommende Beispiele sind Amiclenomycin (warhead) und Stravidin S_2 (mit Amiclenomycin als warhead) zitiert worden (92). Von Amiclenomycin war bisher nur eine Wirkung gegen Mycobakterien beschrieben, von Stravidin war dagegen ein breites Wirkspektrum gegen gramnegative Keime bekannt. Die Ausweitung des Wirkspektrums wurde dem Mißbrauch des Peptidtransportsystems durch das Dipeptid Stravidin S_2 zugeschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wird dagegen gezeigt, daß Amiclenomycin auch ohne vehicle in die E.coli-Zelle transportiert wird und dort antibiotisch wirkt. Ein gutes Beispiel für das vehicle-warhead-Modell liegt somit bei Amiclenomycin und Stravidin S_2 nicht vor.

Ein besseres Beispiel sind vermutlich die chlorierten Produkte der Wirkstoffe. So zeigten äquimolare Mengen der chlorierten Derivate von MeIle-Acm (BC 1) und Ile-Acm-Glu (BC 5) sowie von chloriertem Amiclenomycin im Plattendiffusionstest das geforderte biologische Verhalten:

Wirkstoff	Acm(Cl)	MeIle-Acm(Cl)	Ile-Acm-Glu(Cl)
Hemmhof-durchmesser (mm)	13	>87	45

+) die Angaben beziehen sich auf 10^{-5} mol chlorierten Wirkstoffs pro Testplättchen.

Chloriertes Amiclenomycin (warhead) allein wies nur eine sehr geringe antibiotische Aktivität auf, während bei chloriertem Ile-Acm-Glu (BC 5) und chloriertem MeIle-Acm (BC 1) eine sehr viel stärkere Wirkung zu beobachten war. Diese stärkere Wirkung der chlorierten Peptidantibiotika gegenüber dem chlorierten nichtpeptidischen warhead könnte somit an deren verbesserten Aufnahme über das Oligopeptidtransportsystem liegen. Ein endgültiger Beweis ist allerdings nur über Kompetitionsversuche zu erbringen.

13. EXPERIMENTELLER TEIL

13.1. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel wurden, wenn nicht anders erwähnt, von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.
Die zur Chromatographie, Gegenstromverteilung und Extraktion eingesetzten Lösungsmittel wurden nach den üblichen Methoden absolutiert und vor Verwendung entgast. Lichrosolv-Lösungsmittel wurden nur kurz entgast.
Zur Gelfiltration wurden die Dextrangele Sephadex G 15 (40-120 µ), G 25 Fine (20-80 µ) und LH 20 Fine (25-100 µ) der Firma Pharmacia (Uppsala) eingesetzt.
HPLC-Trennungen wurden an Fertigsäulen der Firmen Bischoff (Leonberg), Knauer (Bad Homburg) und Waters (Königstein) durchgeführt.

13.2. Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel-Fertigplatten 60 F_{254} der Firma Merck (Darmstadt) benutzt.
Die Identifizierung von Dansyl-Aminosäuren erfolgte auf beidseitig beschichteten Polyamidfolien (Wang-Folien) der Firma Macherey & Nagel.
R_F-Werte wurden bei Kammersättigung in DC-Kammern der Firma Camag (Muttenz) ermittelt.

Folgende Fließmittelsysteme kamen zur Anwendung:

I	Chloroform/Methanol/Wasser/17proz. NH_3-Lösung	65:35:4:3
II	1-Butanol/Eisessig/Wasser	2: 1:1
III	Chloroform/Methanol/Wasser	65:25:4
IV	Chloroform/Methanol/Wasser/Eisessig	65:25:4:3
V	Ameisensäure/Wasser	1:24
VI	Eisessig/Benzol	1: 4

13.3. Anfärbemethoden

Zur Detektion dienten bei der Dünnschichtchromatographie:

Ninhydrin-Reagens (93): 0.5 g Ninhydrin wurden in 10 ml 1-Butanol und 3 ml Eisessig gelöst.

Chlor/TDM-Reagens (94): 7.5 g TDM (4,4'-Tetramethyldiaminodiphenylmethan) wurden in 30 ml Eisessig gelöst, mit 150 ml Wasser verdünnt und filtriert.
15 g Kaliumiodid wurden in 300 ml Wasser gelöst und mit obiger Lösung vereint.

Iodkammer: Das Chromatogramm wurde in eine geschlossene DC-Kammer gebracht, auf deren Boden sich einige Körnchen Iod befanden.

13.4. Flüssigkeitschromatographie

13.4.1. Gelchromatographie

Die Säulen (Pharmacia) hatten die Maße 5 cm x 100 cm, ein Bettvolumen von 1.61 l und wurden bei Raumtemperatur betrieben. Eine konstante Flußrate von 60 ml/h wurde mittels einer Pumpe (CFG Duramat) eingehalten.
Bei den Trennungen an Sephadex G 15 und G 25 wurden die Proben (je 5 g) in 0.02 N Essigsäure gelöst, von biologisch inaktivem Rückstand abfiltriert und über die Probenschleife aufgetragen. Für die Trennungen an Sephadex LH 20 wurden je 2 g in wässrigem Methanol (Methanol/Wasser = 7:3) gelöst und wie oben beschrieben aufgetragen. Das Eluat wurde zeitabhängig fraktioniert und mittels Fraktionensammler (Isco) aufgefangen. Die Detektion erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie und Plattendiffusionstest bzw. Bioautographie. Zur Desinfektion wurden die Geräte wöchentlich mit 0.1proz. Natriumazidlösung gespült.

13.4.2. HPLC

Zur High-Performance-Flüssigkeitschromatographie wurden folgende Geräte der Firma Waters eingesetzt: 2 Pumpen M 6000 A, Programmer M 660, Probenaufgabeventil, UV-Detektor M 440 mit den Filtern 254 nm und 280 nm. Ferner wurde mit der HPLC-Anlage SP 8000B (Spectra-Physics, Darmstadt) gearbeitet, mit SPECTROPHOTOMETRIC DETECTOR Modell 770 (Spectra-Physics) und Fraktionensammler CPR RE 45 500 (Gilson, Villiers-le-Bel).

Für analytische Trennungen wurden folgende Säulen verwendet: Fertigsäule µ Bondapak NH_2 3.9 mm x 300 mm (Waters), sowie als Vorsäule eine Hyperchrome-Säule PC 4.6 mm x 40 mm (Bischoff) in Verbindung mit einer Hyperchrome-Säule NC 4.6 mm x 250 mm (Bischoff), beide gefüllt mit Lichrosorb NH_2, Korngröße 5 µ (Merck).

Präparative Trennungen wurden an einer Hyperchrome-Säule Präp 2025 20.5 mm x 250 mm (Bischoff) und einer Vertex-Säule 16 mm x 250 mm (Knauer) durchgeführt, beide gefüllt mit Lichrosorb NH_2, Korngröße 7 µ (Merck). Die Probenmengen betrugen bei den präparativen Trennungen bis zu 100 mg Substanz.

13.5. CRAIG-Verteilung

Für die multiplikative Verteilung nach CRAIG (95,96) kamen Apparaturen der Firma Labortec (Basel) in folgenden Größen zum Einsatz: 110 Glaselemente à 500 ml, 150 Glaselemente à 50 ml, 440 Glaselemente à 10 ml. Ober- und Unterphase des verwendeten Systems wurden hergestellt, indem gleichgroße Volumina von 0.2 N Ammoniak-Lösung und 1-Butanol miteinander gerührt wurden und die gesättigten Phasen anschließend im Scheidetrichter getrennt wurden. Die Auftrennung der Substanzen erfolgte mit 70 Schüttelbewegungen und 30 min Trennzeit pro Stufe.

13.6. Aminosäuren-Analysen

13.6.1. Aminosäurenanalysator

200 - 300 nmol Peptid wurden mit 500 µl 6 N HCl versetzt und in verschraubbaren, konischen Glasampullen (Macherey & Nagel) 24 h bei 110 °C hydrolysiert und im Stickstoffstrom abgeblasen. Der Rückstand wurde in Natriumcitrat-Puffer (pH 2.2) gelöst und die Aminosäuren mittels Standardprogramm an einem Biotronik-Aminosäurenanalysator LC 6000 E sowie einem Beckman Unichrom-Analysator bestimmt (97).

13.6.2. Gaschromatographische Konfigurationsuntersuchungen

13.6.2.1. Acylierung des Hydrolysats

Getrocknetes Hydrolysat (1 mg) wurde mit 2 N HCl (500 µl) in 1-Propanol 1 h bei 110 °C verestert (98), zur Trockene abgeblasen und mit Pentafluorpropionsäureanhydrid (50 µl) in Dichlormethan (500 µl) 10 min bei 150 °C acyliert. Der bei Raumtemperatur im Stickstoffstrom zur Trockene abgeblasene Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen. Die so derivatisierte Probe wurde untersucht an einem Gaschromatographen Fractovap 2150 (Firma Carlo Erba, Hofheim) mit Flammenionisationsdetektor und 20 m Duranglas-Säule, belegt mit Chirasil-Val (17).

13.6.2.2. Darstellung von Urethanderivaten (99)

Das Peptidhydrolysat (1 mg) wurde mit tert.Butylisocyanat (200 µl) in Dichlormethan (200 µl) 15 min bei 100 °C erhitzt und

dann zur Trockene im Stickstoffstrom abgeblasen. Der Rückstand wurde in Dichlormethan aufgenommen und gaschromatographisch untersucht.

13.7. Dansyl-Edman-Abbau

Die Sequenzierung der Peptide erfolgte in Anlehnung an das von HARTLEY (100) beschriebene Verfahren. Dazu wurde 1 mg Peptid in 1 ml Wasser 2 h bei 110 °C erhitzt. Von dieser Lösung wurden 30 µl in eine verschraubbare, konische Glasampulle transferiert und mit 120 µl Wasser verdünnt (Lösung 1). 10 µl dieser Lösung wurden zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäure in einer zweiten Ampulle mit 10 µl einer 0.1 M $NaHCO_3$-Lösung und 20 µl einer frisch hergestellten Lösung von Dansylchlorid in Aceton (1 mg/ml) versetzt und 10 min auf 50 °C erwärmt. Anschließend wurde im Stickstoffstrom abgeblasen. Die Hydrolyse erfolgte mit 100 µl Propionsäure/12 N HCl (1:1) über 3 h bei 130 °C. Dann wurde zur Trockene abgeblasen. Der Rückstand wurde in 5 µl Aceton aufgenommen und 1 µl davon mit einer Kapillare auf 5 x 5 cm große Polyamidfolien (Macherey & Nagel) aufgetragen. Entwickelt wurde in der 1. Dimension mit Laufmittel V, in der 2. Dimension nach 10 minütigem Trocknen bei 110 °C mit Laufmittel VI (32). Die Detektion der Flecken erfolgte im UV-Licht bei 254 nm und 365 nm. Zum Abbau der nunmehr identifizierten N-terminalen Aminosäuren wurde Lösung 1 mit 150 µl einer Lösung von Phenylisothiocyanat in Pyridin (c=50 mg/ml) versetzt. Die Luft wurde durch Spülen mit Stickstoff verdrängt und die Ampulle 90 min

auf 50 °C erwärmt. Darauf wurde das Lösungsmittel im Stickstoffstrom abgeblasen, 200 µl Trifluoressigsäure zugegeben, mit Stickstoff gespült und 30 min bei 50 °C belassen. Nach Abblasen der Trifluoressigsäure wurde der Rückstand in 200 µl Wasser aufgenommen und das entstandene Anilinothiazolinon 4 mal mit 1-Butylacetat extrahiert. Die wässrige Phase wurde zur Trockene eingeengt, in 150 µl Wasser aufgenommen und 10 µl dieser Lösung zur Identifizierung der zweiten Aminosäure, wie oben beschrieben, verwendet.

Zur sicheren Zuordnung der Dansylaminosäure-Flecken wurde bei der Dünnschichtchromatographie auf der Rückseite der beidseitig beschichteten Polyamidkarten jeweils ein Testgemisch aufgetragen, das die möglichen Dansylderivate enthielt. Zur Herstellung dieser Testmischung wurde wie folgt verfahren (32): In 100 µl einer 0.1 M $NaHCO_3$-Lösung wurden je 50 nmol der erwarteten Aminosäuren (Val, MeVal, Ile, MeIle, Glu, Gln, HPhe) gelöst und die Lösung mit einigen µl einer etwa 0.1 M Natriumhydroxidlösung auf pH 10 eingestellt. Dazu wurden 300 µl einer Dansylchloridlösung in Aceton (c=2 mg/ml) gegeben und 10 min auf 50 °C erwärmt. Danach wurde das Lösungsmittel abgezogen, der Rückstand in 50 µl Aceton aufgenommen und von dieser Lösung jeweils 1 µl aufgetragen.

13.8. Darstellung von Derivaten

13.8.1. Selektive Hydrolyse von Amiclenomycin zu Homophenylalanin

Zur selektiven Hydrolyse der vinylständigen Aminogruppe wurden je 10 mg Antibiotikum 90 min bei 100 °C in Wasser (1 ml)

erhitzt und danach in flüssigem Stickstoff eingefroren. Mit verdünnter HCl wurde die Probe bis zur sauren Reaktion versetzt und anschließend im Vakuum zur Trockene eingeengt. Der entstandene Ammoniak wurde quantitativ bestimmt.

13.8.2. Hydrierung

10 mg Peptid wurden in Methanol (3 ml) mit Palladium/Aktivkohle (10 %) im Wasserstoffstrom hydriert.

13.8.3. Iodierung

10 mg Peptid wurden einer wässrigen Iodlösung bei Raumtemperatur ausgesetzt.

13.8.4. Chlorierung

10 mg Peptid wurden in Methanol (3 ml) bis zur sauren Reaktion mit HCl versetzt und 30 min unter Rühren im Chlorstrom umgesetzt.

13.8.5. Oxidation mit Kaliumpermanganat

10 mg Peptid wurden in Wasser (1 ml) mit einer 1prozentigen Kaliumpermanganatlösung oxidiert. Die auf 0 ^{o}C abgekühlte Kaliumpermanganatlösung wurde dazu tropfenweise zugegeben, bis keine Entfärbung mehr auftrat. Nach beendeter Reaktion wurde das ausgefallene Mangandioxid abzentrifugiert und die wässrige Lösung im Vakuum eingeengt.

13.8.6. Acylierung

10 mg Peptid wurden in Pyridin (1 ml) und Acetanhydrid (500 µl) 24 h bei 25 °C acetyliert. Das erhaltene Öl wurde durch präparative DC an Kieselgel gereinigt.

13.8.7. Veresterung

10 mg Peptid wurden in Methanol (3 ml) gelöst und mit 1 N HCl bis zur sauren Reaktion (pH 1) versetzt. Nach 48 h bei Raumtemperatur wurde zur Trockene eingeengt. Das ölige Produkt wurde mittels präparativer DC an Kieselgel gereinigt.

13.8.8. Darstellung von N-Acetyl-peptid-methylestern

10 mg Peptid wurden in Methanol (3 ml) gelöst und mit Acetanhydrid (500 µl) 24 h bei 25 °C verestert und acyliert.

13.8.9. Reduktive Alkylierung

10 mg Peptid wurden in 0.1 N NaOH (1 ml) gelöst, auf 0 °C gekühlt und mit Aceton (1 ml) versetzt. Zu dieser Lösung wurde nach einigen Minuten 4 x 200 µl einer wässrigen Natriumboranatlösung (c=5 mg/ml) pipettiert. Nach 1 min wurde nochmals 1 ml Natriumboranatlösung zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über präparative DC an Kieselgel gereinigt.

13.8.10. Epoxidierung

10 mg Peptid in 100 µl Wasser wurden mit 3 ml Acetonitril versetzt, in denen m-Chlorperbenzoesäure (110 mg) gelöst war.

Nach 48 h bei Raumtemperatur wurde zur Trockene eingeengt und das Produkt mittels präparativer DC an Kieselgel gereinigt.

13.9. Spektroskopische Untersuchungsmethoden

13.9.1. NMR-Spektroskopie

Zur Aufnahme der NMR-Spektren (101) wurden die Substanzen in 500 µl $^{2}H_{2}O$ gelöst. ^{1}H-NMR-Spektren wurden an einem Bruker WH-90-Spektrometer (90 MHz) (Firma Bruker, Karlsruhe) und an einem Bruker WH-400-Spektrometer (400.13 MHz) bei 25 °C aufgenommen. An diesen Geräten wurden auch die ^{1}H-breitbandentkoppelten ^{13}C-NMR-Spektren aufgenommen. Die Meßfrequenz betrug dabei 100.6 MHz (WH-400) beziehungsweise 22.628 MHz (WH-90).

13.9.2. Massenspektroskopie

FD-Spektroskopie: Die Massenspektren wurden am Spektrometer MAT 711 (Varian, Bremen) aufgenommen (102), das mit dem Datensystem SS 200 gekoppelt ist. Die Ionenquellentemperatur betrug bei den Aufnahmen von Feld-Desorptions-Massenspektren stets 60 °C.

GC-MS-Spektroskopie: Die GC-MS-Kopplung bestand aus dem Gaschromatographen Fractovap 2900 (Carlo Erba, Hofheim) und einem Massenspektrometer MAT 112 S (Variam, Bremen)(103).
Zur Aufnahme der GC-MS-Spektren wurden die Substanzen wie folgt derivatisiert:

a) Veresterung

10 mg N-Nitroso-N-methyl-p-toluolsulfonamid wurden in Ether gelöst. Bei 0 °C wurden 2 ml einer 5proz. Lösung von Kaliumhydroxid in 95proz. Ethanol zugegeben. Nach 5 min wurde auf 40 °C erwärmt und das entweichende Diazomethan in eine auf 0 °C gekühlte Lösung von Peptid (1 mg) in Methanol (250 µl) eingeleitet. Nach einer Reaktionszeit von 30 min bei Raumtemperatur wurde im Stickstoffstrom abgeblasen.

b) Trifluoracetylierung

Die veresterten Proben wurden anschließend mit 500 µl einer 20proz. Lösung von Trifluoressigsäureanhydrid in Dichlormethan umgesetzt. Die verschlossene Ampulle wurde 10 min auf 50 °C erwärmt und dann im Stickstoffstrom abgeblasen.

13.9.3. IR-Spektroskopie

Mit jeweils 2 mg der Antibiotika und 0.5 g Kaliumbromid wurden Kaliumbromid-Presslinge hergestellt und in einem IR-Spektrometer IFS 114 C der Firma Bruker (Karlsruhe) vermessen (104).

13.9.4. CD-Spektroskopie

Zur Aufnahme der Circulardichroismus-Spektren wurden je 5 mg der Antibiotika in 2 ml Wasser gelöst und in Küvetten der Schichtdicken 0.01 und 0.05 cm mit einem Spektrograph Dichrograph CD 185 der Firma Roussel-Jouan (Paris) vermessen (105).

13.10. Biologische Tests und Materialien

13.10.1. Zusammensetzung der Fermentationsmedien

Komplexmedium: 4000 g Fleischextrakt, 4000 g Malzextrakt, 200 l Leitungswasser (pH 7.2).

Minimalmedium: 6 l Glycerin (98%), 1000 g Glukose, 348 g KH_2PO_4, 2000 g $(NH_4)_2SO_4$, 2000 g $MgHPO_4$, 200 ml Spurenelementlösung, 200 l entionisiertes Wasser (pH 5.5).

13.10.2. Herstellung der Testplatten

Zur Herstellung von Braun Flexner Agar werden 3.2 g Na-Lactat, 2.5 g $NaSO_4$x 1 H_2O, 0.25 g KH_2PO_4, 0.75 g K_2HPO_4x 1 H_2O, 0.05 g $MgCl_2$x 2 H_2O, 2.5 g NH_4Cl, 5.0 g Glucose und 7.5 g Agar in 500 ml entionisiertem Wasser gelöst, auf pH 7.2 eingestellt und 20 min bei 121 °C autoklaviert. Eine Keimsuspension von E.coli 12593/74 in 0.9proz. steriler Kochsalzlösung wird am Eppendorf-Photometer auf eine Extinktion von 0.62 bei 546 nm eingestellt. 100 ml Braun Flexner Agar werden mit 1.25 ml einer 1 : 100-Verdünnung der Suspension beimpft. 4 ml dieses Topagars werden mit einer Spritze auf je 19 ml Braun Flexner Grundagar in Petrischalen gegeben.

13.10.3. Plattendiffusionstest

Filterrondellen (Durchmesser 6 mm, Macherey & Nagel) werden mit 20 µl Antibiotikalösung getränkt, getrocknet und auf Testplatten aufgelegt. Nach 15 h Inkubation bei 37 °C wird der Hemmhofdurchmesser bestimmt.

13.10.4. Bioautographie von Chromatogrammen

Auf das entwickelte Dünnschichtchromatogramm wurde ein Tesafilmstreifen geklebt und in 3 mm breite Abschnitte unterteilt. Diese wurden einzeln abgezogen und auf Testplatten aufgelegt. Dann wurde 15 h bei 37 °C inkubiert.

13.10.5. Vitamin E-Kreuztest

Auf eine beimpfte Braun Flexner Platte wurde ein mit α-Tocopherolacetatlösung (c=5 mg/ml, Firma Thomae, Biberach) getränkter Papierstreifen (5 x 0.5 cm) gelegt. Ein gleich großer Papierstreifen wurde mit 20 µl Antibiotikalösung getränkt und quer über den Streifen mit der Vitaminlösung gelegt. Die Platte wurde anschließend 15 h bei 37 °C inkubiert.

13.10.6. Enzymatische Spaltung mit Pronase P

0.5 mg Pronase P aus Streptomyces griseus (Serva, Heidelberg) wurden in 1 ml 0.01 M Na_2HPO_4-Puffer (3.58 g Na_2HPO_4x 12 H_2O in 1 l 0.9proz. Kochsalzlösung, mit 1 M HCl auf pH 7.0 eingestellt) gelöst. 10 ul dieser Lösung wurden rasch zu 100 µl Peptidlösung (c=5 mg/ml in 0.01 M Na_2HPO_4-Puffer) pipettiert. Anschließend wurde 8 h bei 37 °C inkubiert.

13.10.7. Lymphozyten-Proliferationstest (106)

Milzzellen aus Balb/c-Mäusen (3.3 x 10^6/ml) wurden zusammen mit dem Antibiotikum (273 ug/ml) gelöst und dann in Zellkulturmedium in einer 1:5-Verdünnungsreihe mit 0.183 ml pro Ansatz

in Falcon-Mikrotiterplatten pipettiert. Ein weiterer Ansatz enthielt Concanavalin A in einer Endkonzentration von 2 µg/ml als Mitogen. Nach 48 h Inkubation bei 37 °C wurden die Zellkulturen zur Bestimmung der Einbauraten mit ^{3}H-Thymidin (0.5 µCi/Kultur) markiert und nach weiteren 24 h Inkubation geerntet; die Ergebnisse stellen Mittelwerte aus zwei Parallelansätzen dar.

14. ZUSAMMENFASSUNG

Aus dem Kulturfiltrat von Streptomyces venezuelae ssp. xanthophaeus konnten sechs Antibiotika BC 1 - 6 isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt werden.

Neben BC 1 und BC 3, die sich als die bereits bekannten Antibiotika Stravidin S_2 und S_3 erwiesen, fanden sich vier neue Wirkstoffe. Es handelt sich bei diesen Verbindungen um Di- und Tripeptide, die die Aminosäure Amiclenomycin enthalten.

Die Aufreinigung erfolgte durch Adsorption an XAD und anschließender Desorption mit Aceton. Nach multiplikativer Verteilung können die sechs Wirkstoffe entweder direkt in einem Trennungslauf mittels HPLC an einer Aminphase erhalten werden oder durch Gelchromatographie und erneute multiplikative Verteilung rein dargestellt werden.

Durch enzymatische Abbaureaktion konnten zwei weitere Antibiotika erhalten werden. Neben einem neuen Wirkstoff lag damit auch der Grundkörper Amiclenomycin vor.

Bei den Wirkstoffen handelt es sich um Biotinantimetaboliten, die vor allem das Wachstum gramnegativer Bakterien hemmen. Die antibiotische Wirkung erfolgt durch Blockierung der Biotinbiosynthese. Ferner wurde mit BC L ein Polypeptid isoliert, das die Wirkung der Antimetaboliten synergistisch verstärkt.

Von den Wirkstoffen konnten Derivate dargestellt und charakterisiert werden, die Aussagen zur Struktur-Wirkungsbeziehung erlaubten.

Durch Chlorierung der Antimetaboliten wurde eine deutliche Wirkungssteigerung erzielt. Die Hemmung kann durch Biotin nicht mehr aufgehoben werden, ein neuer Wirkmechanismus liegt vor.

15. LITERATURVERZEICHNIS UND DANKSAGUNGEN

(1) Eur.J.Biochem. 74, 1 (1977).

(2) H.Zähner, Angew.Chem. 89, 696 (1977).

(3) S.J.Waksman, The Actinomycetes, Williams & Williams, Baltimore 1962.

(4) D.W.Woolley, in Metabolic Inhibitors, (R.M.Hochster und J.H.Questel), Vol.1, S.445, Academic Press, New York 1952.

(5) D.W.Woolley, A study of antimetabolites, Wiley, New York 1952.

(6) J.C.Somogyi, in Metaboliten und Antimetaboliten, Ergeb.med.Grundlagenforsch. (K.F.Bauer), Thieme, Stuttgart 1956.

(7) D.L.Pruess und J.P.Scannell, Adv.Appl.Microbiol. 17, 19 (1974).

(8) Antimetabolites in Biochemistry, Biology and Medicine, FEBS Vol.57 (J.Skoda, P.Langen), Pergamon, Oxford 1979.

(9) E.Bayer, K.H.Gugel, K.Hägele, H.Hagenmaier, S.Jessipow und W.A.König, Helv.Chim.Acta 55, 224 (1972).

(10) F.Tanaka, S.Takenchi und N.Tanaka, J.Antibiot. 14, 161 (1961).

(11) G.Koyama und H.Umezawa, J.Antibiot. 18, 175 (1965).

(12) E.Stahl, Dünnschichtchromatographie, Springer, Heidelberg 1967.

(13) Diese Bestimmung wurde freundlicherweise von Dr. R.Werner bei Thomae, Biberach durchgeführt.

(14) L.C.Craig, J.Biol.Chem. 150, 33 (1943).

(15) K. und M.Hostemann, Fachz.Lab.Suppl.Chem. 22 (1981).

(16) C.Wasternack, Pharmazie 27, 67 (1972).

(17) H.Frank, G.J.Nicholson und E.Bayer, J.Chrom.Sci. 15, 174 (1977).

(18) H.Frank, G.J.Nicholson und E.Bayer, J.Chromatogr. 146, 197 (1978).

(19) M.Poetsch, Diplomarbeit, Universität Tübingen 1982 .

(20) P.Kurtz, in Methoden der organischen Chemie (Huoben-Weyl-Müller), 4.Aufl., Bd.VIII, S.274, Thieme, Stuttgart 1952.

(21) E.L.Eliel, N.L.Allinger, S.J.Augyal und G.A.Morrison, in Conformational Analysis, S.125, Interscience, New York 1965.

(22) L.J.Durham, J.Studebaker und M.J.Perkins, J.Chem. Soc.Chem.Comm., 1965, 456.

(23) K.Wüthrich, NMR in Biological Research: Peptides and Proteins, North-Holland, Amsterdam 1976.

(24) W.Voelter, G.Jung, E.Breitmaier und E.Bayer,Z.Naturforsch. 26b, 213 (1971).

(25) W.A.König, I.Beneke, N.Lucht, E.Schmidt, J.Schulze und S.Sievers, in 5th Int. Symp. on capillary chromatography (J.Rijks), S.609, Riva 1983.

(26) P.Edman und A.Henschen, in Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics, Bd.8, Protein Sequence Determination, S.232, Springer, Berlin 1975.

(27) H.C.Beyerman, L.Maat, A.Sinnemar und A.von Veen, Rec.Trav.Chim.Pays-Bas 87, 11 (1968).

(28) M.Waterfield und E.Haber, Biochemistry 9, 832 (1970).

(29) S.Ellis, T.Fairwell und R.E.Lovins, Biochem.Biophys. Res.Comm. 49, 1407 (1972).

(30) E.Schulze und V.Neuhoff, Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem. 357, 225 (1976).

(31) E.Schulze und V.Neuhoff, Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem. 357, 593 (1976).

(32) H.Laatsch, J.Chromatogr. 173, 398 (1979).

(33) F.Weyggand, B.Kolb, A.Prox, M.A.Tilak und I.Tomida, Z.Anal.Chem. 322, 38 (1960).

(34) H.Gerding und F.A.Haak, Rec.trav.chim. 68, 293 (1949).

(35) H.D.Stidham, Spectrochim.Acta 21, 23 (1965).

(36) A.I.Scott und A.D.Wrixon, Chem.Comm. 1969, 1182.

(37) A.I.Scott und A.D.Wrixon, Tetrahedron 26, 3695 (1970).

(38) M.Fetizon und I.Hanna, Chem.Comm. 1970, 462.

(39) A.Yogev, D.Amar und Y.Mazur, Chem.Comm. 1967, 339.

(40) G.Snatzke, Angew.Chem. 80, 15 (1968).

(41) L.W.Pickett und E.Sheffield, J.Am. Chem.Soc. 68, 216 (1946).

(42) K.H.Baggaley, B.Blessington, C.P.Falshaw und W.D. Ollis, Chem.Comm. 1969, 101.

(43) E.O.Stapley, J.M.Mata, I.M.Miller, T.C.Demny und H.B.Woodruff, Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1963, 20.

(44) L.Chaiet, T.W.Miller, F.Tausig und F.J.Wolf, Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1963, 28.

(45) A.K.Miller, Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1963, 33.

(46) Y.Okami, T.Kitahara, M.Hamada, N.Naganawa, S.Kondo, K.Maeda, T.Takeuchi und H.Umezawa, J.Antibiot. 27, 656 (1974).

(47) M.Poetsch, persönliche Mitteilung.

(48) R.Werner, persönliche Mitteilung.

(49) F.Tausig und F.J.Wolf, Biochem.Biophys.Res.Comm. 14, 205 (1964).

(50) L.Chaiet und F.J.Wolf, Arch.Biochem.Biophys. 106, 1 (1964).

(51) F.Kögl und L.Tönnis, Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem. 242, 43 (1936).

(52) J.Moss und M.D.Lane, in Advances in Enzymology (F.F.Nord), Bd.35, S.321, Interscience, New York 1971.

(53) D.B.McCormick und C.D.Wright, in Competitive Biochemistry, (M.Flarkin und E.H.Stotz), Bd.21, S.81, Elsevier, Amsterdam 1971.

(54) J.Moss und M.D.Lane, J.Biol.Chem. 247, 4952 (1972).

(55) M.György, Z.ärztl.Fortbild. 28, 377 (1931).

(56) R.E.Eakin, E.E.Snell und R.J.Williams, J.Biol. Chem. 136, 801 (1940).

(57) F.Tausig und F.J.Wolf, Biochem.Biophys.Res.Comm. 14, 205 (1964).

(58) S.H.Rubin und J.Schreiner, Arch.Biochem. 23, 400 (1949).

(59) K.Dittmer,V.DuVigneaud, P.György und C.S.Rose, Arch.Biochem. 4, 229 (1944).

(60) L.J.Hanka, M.E.Bergy und R.B.Kelly, Science 154, 1667 (1966).

(61) L.J.Hanka, D.G.Martin und L.M.Reineke, Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1, 135 (1972).

(62) J.P.English, R.C.Clapp, Q.P.Cole, I.F.Halverstadt, J.O.Lampen und R.O.Roblin, J.Am.Chem.Soc. 67, 295 (1945).

(63) D.B.Melville, K.Dittmer, G.B.Brown und V.DuVigneaud, Science 98, 497 (1944).

(64) K.Dittmer und V.DuVigneaud, J.Biol.Chem. 169, 63 (1947).

(65) J.R.Schenck und A.F.deRose, Arch.Biochem.Biophys. 40, 263 (1952).

(66) M.A.Eisenberg, Adv.Enzymol. 38, 317 (1973).

(67) T.Kitahara, K.Hotta, M.Yoshida und Y.Okami, J.Antibiot. 28, 215 (1975).

(68) Für diese Ergebnisse danke ich Herrn Dr.R.Werner, Thomae.

(69) J.Cybulla, H.Brückner, G.Jung, Th.Wipperfürth und W.G.Bessler, Biochem.Biophys.Res.Comm. 92, 1389 (1980).

(70) W.G.Bessler, R.B.Johnson, K.H.Wiesmüller und G.Jung, Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 363, 767 (1982).

(71) Ich danke Frau M.Pfeiffer und Herrn Prof.Dr.W.G. Bessler für die Durchführung der Testreihe.

(72) C.L.Hermsdorf und S.Simmonds, in Microorganisms and Nitrogen Sources (J.W.Payne), S.301, Wiley, London 1980.

(73) Y.Okami, T.Kitahara, M.Hamada, N.Naganawa, S.Kondo, K.Maeda, T.Takeuchi und H.Umezawa, J.Antibiot. 27, 656 (1974).

(74) G.E.Means und R.E.Feeney, Biochemistry 7, 2192 (1975).

(75) N.D.Zelinsky, Ber. 64, 1399 (1931).

(76) P.Bedos, Compt.rend. 196, 625 (1941).

(77) M.Tiffeneau und B.Tschoubar, Compt.rend. 212, 581 (1941).

(78) N.N.Schwartz und J.H.Blumberg, J.Org.Chem. 29, 1976 (1964).

(79) N.D.Zelinsky und P.Pawlow, Ber. 66, 1420 (1933).

(80) J.W.Payne, in Microorganisms and Nitrogen Sources (J.W.Payne), S.223, Wiley, London 1980.

(81) M.Dorgerloh, Dissertation, Universität Tübingen 1980.

(82) H.Diddens, Dissertation, Universität Tübingen 1979.

(83) B.N.Ames, G.F.L.Ames, J.D.Young, D.Tsuchiya und J.Cecocq, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 70, 456 (1973).

(84) T.E.Fickel und C.Gilvarg, Nat.New.Biol. 241, 161 (1973).

(85) D.W.Matthews und J.W.Payne, in Peptide Transport in Protein Nutrition (D.M.Matthews, J.W.Payne), S.392, North-Holland, Amsterdam 1975.

(86) M.Kenig, E.Vandamme und E.P.Abraham, J.Gen.Microbiol. 94, 46 (1976).

(87) K.V.Rao, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1961, 178.

(88) E.Kraas, Dissertation, Universität Tübingen 1975.

(89) H.Diddens, H.Zähner, E.Kraas, W.Göhring und G.Jung, Eur.J.Biochem. 66, 11 (1976).

(90) H.Brückner, G.Jung, R.G.Werner und K.R.Appel, Arzneimittelforsch., 1983, im Druck.

(91) H.Kihara und E.E.Snell, J.Biol.Chem. 235, 115 (1960).

(92) P.S.Ringrose, in Microorganisms and Nitrogen Sources (J.W.Payne), S.641, Wiley, New York 1980.

(93) A.R.Fahmy, A.Niederwieser, G.Pataki und M.Brenner, Helv.Chim.Acta 44, 2022 (1960).

(94) E.vanArx, M.Fampel und M.Brugger, J.Chromatogr. 120, 224 (1976).

(95) L.C.Craig, J.Biol.Chem. 155, 519 (1944).

(96) R.P.King und L.C.Craig, Meth.Biochem.Anal. 10, 201 (1962).

(97) Für diese Analysen danke ich Frau M.Munari,Tübingen.

(98) H.Frank, D.Bimboes und G.J.Nicholson, Chromatographia 12, 168 (1979).

(99) W.A.König, F.Benecke, N.Lucht, E.Schmidt, J.Schulze und S Sievers, in 5th Int. Symp. on capillary chromatography (J.Rijks), S.609, Riva 1983.

(100) B.S.Hartley, Biochem.J. 119, 805 (1970).

(101) Für die Aufnahme der NMR-Spektren danke ich H.Kolshorn, R.Brettauer, K.P.Voges (Tübingen) und Prof.Dr.A.Prox (Thomae, Biberach).

(102) Für die Aufnahme der FD-Massenspektren danke ich Herrn H.Bartholomä (Tübingen).

(103) Für die Aufnahme der GC-MS-Spektren danke ich Herrn G.Nicholson (Tübingen).

(104) Herrn M.Farag (Tübingen) danke ich für die Messung der IR-Spektren.

(105) Frau M.Munari (Tübingen) danke ich für die Aufnahme der CD-Spektren.

(106) R.B.Johnson, S.Koehl, K.H.Wiesmüller, G.Jung und W.G.Bessler, Immunbiol. 165, 27 (1983).

Meine akademischen Lehrer waren die Herren:

E. Bayer, W. Braun, E. Breitmaier, G. Gauglitz, F. Gönnenwein, G. Häfelinger, H. Hagenmaier, M. Hanack, V. Hoffmann, G. Jung, Frau S. Kemmler-Sack, D. Krug, U. Kunze, E. Lindner, I.P. Lorenz, M. Mauser, E. Müller, H. Oberhammer, D. Oelkrug, H. Pauschmann, G. Pausewang, A. Rieker, W. Rüdorff, W. Rundel, V. Schurig, F. F. Seelig, H. Stegmann, J. Strähle, H. Suhr, W. Voelter und W. Zeil.

L E B E N S L A U F

Kern, Armin

9.8.1953	geboren in Stuttgart-Bad Cannstatt
	Vater : Artur Kern
	Mutter: Helene geb. Rüb
1960 - 1962	Grundschule in Kornwestheim
1962 - 1964	Grundschule in Marbach/N.
1964 - 1972	Friedrich-Schiller-Gymnasium Marbach/N.
19.6.1972	Abitur
WS 1972/73	Immatrikulation für das Fach Chemie
	an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
29.9.1975	Vordiplom in Chemie
WS 1979/80	Immatrikulation für das Fach Medizin
	an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
18.7.1980	Diplom in Chemie
1980/81	Diplomarbeit bei Prof. Dr. G. Jung
	"Reinigung und Charakterisierung des
	Peptidantibiotikums Tü 1718 B"
August 1981	Beginn der Untersuchung zu:
	"Amiclenomycin-Peptide, Isolierung und Struk-
	turaufklärung neuer Biotin-Antimetaboliten"
	bei Prof. Dr. G. Jung am Institut für
	Organische Chemie der Universität Tübingen.